

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Možnost prodloužení úchovy čerstvého kuřecího masa
pomocí silic enkapsulovaných do jílových nanočástic**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Zuzana Vojtíšková

Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Možnost prodloužení úchovy čerstvého kuřecího masa pomocí silic enkapsulovaných do jílových nanočástic“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.4.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlovi Kloučkovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval při konzultacích, za cenné rady i přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. za cenné rady při přípravě senzorické analýzy. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit poděkování rodině, zvláště pak příteli Michalovi, který mi byl po dobu přípravy této diplomové práce velkou oporou.

Možnost prodloužení úchovy čerstvého kuřecího masa pomocí silic enkapsulovaných do jílových nanočástic

Souhrn

Tato diplomová práce má za cíl představit rostlinné silice jako účinné antimikrobiální látky vhodné pro konzervaci potravin, se zaměřením na údržnost masa. Maso je potravina, která díky vysokému obsahu živin, snadno podléhá mikrobiálnímu kažení. Kažení masa lze oddálit výběrem vhodné konzervační metody. V současné době jsou stále více využívány tzv. moderní konzervační metody, které se od klasických konzervačních zákroků liší především v šetrnosti k dané potravíně. Za nadějnou metodu lze považovat konzervaci pomocí rostlinných silic.

V experimentální části diplomové práce je hodnocen účinek silic enkapsulovaných do jílových nanočástic na údržnost čerstvého kuřecího masa. Pro účely experimentu byly použity tymiánová silice a silice ze saturejky ve dvou rozdílných koncentracích (silice:nanojíl - 1:5, 1:10 w/w). Kousky kuřecího masa (5 g) byly zaočkovány bakterií *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) a *Escherichia coli* (ATCC 25922) a následně obaleny v jílových nanočásticích s enkapsulovanou silicí. Takto ošetřené maso bylo skladováno při 4 °C a vyhodnocováno 1., 7. a 14. den skladování společně se třemi kontrolami. Vzorky kuřecího masa byly zkoumány z hlediska mikrobiologických parametrů, kdy byl hodnocen jejich inhibiční efekt proti patogenním bakteriím. Vzorky byly podrobeny také sensorické analýze, která měla stanovit případný vliv silic na organoleptické vlastnosti masa.

Výsledky potvrdily antimikrobiální účinnost obou silic proti patogenním bakteriím. Tymiánová silice však vykazovala větší inhibiční účinek ve srovnání se silicí ze saturejky. U obou testovaných bakterií došlo vlivem přídavku tymiánové silice ke snížení jejich počtu o více jak 3,5 log KTJ.g⁻¹ v porovnání s kontrolami.

Méně příznivé výsledky byly zaznamenány v případě sensorické analýzy, neboť z hlediska organoleptických vlastností nebyly dané koncentrace silic hodnotiteli přijímány kladně. Ve vzorcích ošetřených silicemi tak převládala nežádoucí hořká a štiplavá chuť.

Tato práce potvrdila antimikrobiální aktivitu silic tymiánu a saturejky, kterou lze využít při konzervaci čerstvého masa. Avšak reálné použití silic v potravinářství může být značně omezeno jejich vlivem na organoleptické vlastnosti produktu.

Klíčová slova: maso, konzervace, silice, jílové nanočástice

The Application of Essential Oils Encapsulated into Nanoclay for Shelf-life Improvement of Fresh Chicken meat

Summary

This dissertation aims to introduce essential oils as effective antimicrobial substances suitable for food preservation, focusing on the shelf life of meat. Meat is food which is - due to its high nutrient content - susceptible to microbial spoilage. Decaying of meat can be delayed by the selection of appropriate preservation methods.

Nowadays there are increasingly used preservative modern methods which differ from classical preservatives procedures mainly in the consideration to the food. As very promising method can be considered preservation by essential oils.

In the experimental part of this thesis the effect of encapsulated essential oils into the clay nanoparticles for the shelf life of fresh chicken meat is assessed. For the purpose of the experiment thyme essential oil and oil of savory in two different concentrations (oil:nanoclay - 1:5, 1:10 w/w) were used. Pieces of chicken meat (5 g) were inoculated with *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) and then coated with the clay nanoparticles with the encapsulated essential oils. That treated meat was stored at 4 °C and assessed at 1st, 7th and 14th day of storage, together with three controls. Samples of the chicken meat were explored in terms of microbiological parameters and their inhibitive effect against pathogenic bacteria was examined. Samples were also subjected to sensory analysis, which should provide potential impact of essential oils on the organoleptic characteristics of meat.

The results confirmed the antimicrobial activity of both essential oils against pathogenic bacteria. Thyme essential oil, however, showed greater inhibitory activity compared with oil of savory. Thyme essential oil has reduced in both tested bacteria their number in more than 3.5 log CFU.g⁻¹ compared to the controls.

Less favorable results were observed in the case of sensory analysis, because in terms of organoleptic characteristics the concentrations of oils were not accepted positively by the assessors. The samples treated with essential oils had undesirable bitter and pungent taste.

This work confirmed the antimicrobial activity of thyme and savory essential oils, which can be used for preservation of fresh meat. But the real application of the essential oils in food may be significantly limited by their impact on the organoleptic characteristics of the product.

Keywords: meat, preservation, essential oils, nanoclay

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Vědecká hypotéza a cíl práce	10
2.1 Vědecká hypotéza.....	10
2.2 Cíl práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Mikrobiální změny masa	11
3.1.1 Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů.....	11
3.1.1.1 Vnitřní faktory	12
3.1.1.2 Vnější faktory	12
3.1.1.3 Implicitní faktory	13
3.1.2 Projevy kažení masa	14
3.1.2.1 Lipidy	14
3.1.2.2 Dusíkaté látky	15
3.1.2.3 Hemová barviva.....	16
3.1.3 Patogeny.....	17
3.1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	18
3.1.3.2 Rod <i>Salmonella</i>	19
3.1.4 Moderní konzervační metody	21
3.1.4.1 Vysokotlaké ošetření	22
3.1.4.2 Ionizační záření	22
3.1.4.3 Ochranné balení.....	24
3.1.4.4 Biokonzervace a přírodní antimikrobiální látky.....	25
3.2 Silice.....	26
3.2.1 Historie silic	26
3.2.2 Výskyt silic	28
3.2.3 Způsoby získávání silic.....	29
3.2.4 Chemická struktura silic	29
3.2.5 Hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>).....	31
3.2.5.1 Tymián.....	31
3.2.5.2 Saturejka	32
3.2.6 Mechanismus účinku silic.....	33
3.2.7 Současné využití silic.....	34
3.2.8 Antimikrobiální aktivita silic v potravinách	35
3.2.8.1 Maso a masné výrobky	36

3.2.9	Omezení a limity využití silic	40
4	Materiál a metody	42
4.1	Silice.....	42
4.2	Kmeny bakterií.....	42
4.3	Kuřecí maso	42
4.4	Příprava vzorků	42
4.4.1	Enkapsulace silic do jílových nanočástic.....	42
4.4.2	Příprava bakteriálního inokula.....	43
4.4.3	Příprava a ošetření kuřecího masa	43
4.5	Metody analýzy.....	44
4.5.1	Mikrobiologická analýza	44
4.5.2	Senzorická analýza	46
4.6	Statistické vyhodnocení	47
5	Výsledky	48
5.1	Vyhodnocení mikrobiologické analýzy	48
5.1.1	Bakterie <i>Salmonella enteritidis</i>	48
5.1.2	Bakterie <i>Escherichia coli</i>	50
5.1.3	Celkové počty mikroorganismů.....	52
5.2	Vyhodnocení senzorické analýzy	55
6	Diskuze	59
7	Závěr.....	63
8	Seznam literatury	64
9	Přílohy	72
10	Seznam tabulek	78
11	Seznam grafů	79

1 Úvod

Maso je u konzumentů velmi vyhledávanou potravinou, která nabízí široké kulinářské využití. Kromě svých chuťových vlastností je maso také důležitou složkou racionální stravy, neboť je dobrým zdrojem bílkovin a důležitých mikronutrientů. Avšak právě vysoký obsah živin předurčuje maso k rychlému kažení.

Kažení masa je nežádoucí proces, který má dopad nejen na organoleptické vlastnosti potravin, nýbrž často nepříznivě ovlivňuje zdraví konzumenta. Přesto všechno je kažení masa děj zcela přirozený a neodvratitelný, a lze ho pouze oddálit pomocí výběru vhodné konzervační metody. V dnešní době se upouští od používání klasických metod konzervace, naopak se mnohem častěji využívají tzv. moderní konzervační zákroky, které s sebou přinášejí řadu výhod jak pro konzumenta, tak i pro výrobce. Jejich přednost spočívá především v jejich šetrnosti, díky které nedochází k výrazné změně chuti, vůně a vzhledu výrobku, dokonce se nemění ani nutriční vlastnosti potravin. Ošetření potravin moderními způsoby konzervace také může představovat vhodnou alternativu k chemickým konzervantům, které nejsou v očích konzumentů vítaným přídavkem do potravin.

Jednou z možností ochrany potravin před mikrobiálním kažením, je aplikace antimikrobiálních látek jako konzervantů. Jako nadějně se, v tomto směru, zdá být využití rostlinných silic, které svou antimikrobiální účinnost prokázaly již v mnoha studiích. Problémem však může být jejich začlenění do potravin, neboť způsob aplikace silic může značně ovlivnit nejen jejich antimikrobiální účinnost, ale například i chuťové vlastnosti produktu, které vždy nemusejí být pro konzumenta akceptovatelné.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

2.1 Vědecká hypotéza

Silice enkapsulované do jílových nanočástic mají pozitivní vliv na prodloužení trvanlivosti kuřecího masa.

Díličí hypotézou je tvrzení, že silice enkapsulované do jílových nanočástic potlačují růst vybraných patogenních mikroorganismů bez negativního ovlivnění chuti kuřecího masa.

2.2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je stanovení účinku silic enkapsulovaných do jílových nanočástic na vybrané druhy bakterií podílejících se na kažení kuřecího masa.

Díličím cílem je ověření, zda je tento způsob aplikace rostlinných silic vhodným prostředkem pro inhibici bakterií a zda je z hlediska chuti akceptovatelný pro konzumenty.

3 Literární rešerše

3.1 Mikrobiální změny masa

Maso je potravina, která není-li správně skladována, zpracována, balena a distribuována, kazí se velmi rychle a je nebezpečná díky přítomnosti mikroorganismů (McDonald and Sun, 1999). Mikrobiální kvalita masa závisí na fyziologickém stavu zvířete v okamžiku porážky, na rozšíření kontaminace během porážky a zpracování, na teplotě a dalších podmínkách skladování a distribuce (Nychas et al., 2008). Z počátečně přítomné mikrobiální populace na jatečně upraveném těle zvířete po porážení, přispívá ke kažení pouze část bakterií (Kameník, 2013). Borch et al. (1996) navíc uvádějí, že pouze 10 % bakterií zpočátku přítomných na mase je schopné růst za chladírenských teplot. Mikrobiální frakce, která je schopná vyvolat kažení masa je o to menší.

Přes veškeré moderní potravinářské technologie a zlepšení hygieny na jatkách je otázka bezpečnosti potravin stále významným problémem v oblasti veřejného zdraví (Burt, 2004). Alimentární infekce, tedy onemocnění, při kterém je nositelem infekční látky potravina nebo voda, jsou významné zejména proto, že mohou náhle způsobit velké epidemie postihující stovky i tisíce lidí (Bardoň, 2008). Nejzávažnější bezpečnostní problémy týkající se masa, které způsobují vážné zdravotní komplikace spotřebitelů, jsou spojeny s mikroorganismy, a to zejména s bakteriálními patogeny (Sofos, 2008). Nemoci jimi způsobené jsou stále velkou hrozbou jak pro výrobce masa a masných výrobků, tak i pro konzumenty těchto produktů (Kerth, 2013).

3.1.1 Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů

Růst bakterií, které vyvolávají kažení potravin, ovlivňuje podle Brucknera et al. (2012) celá řada faktorů, které je možno rozdělit do čtyř skupin na tzv. vnitřní, vnější, technologické a implicitní faktory. Vnitřní faktory vyjadřují fyzikální a chemické vlastnosti potravin samotných. Příkladem těchto faktorů je vodní aktivita, obsah živin, hodnota pH či struktura potraviny. Naproti tomu vnější faktory zahrnují podmínky skladování jako je skladovací teplota a složení atmosféry. V případě fyzikálního nebo chemického ošetření během zpracování potraviny mluvíme o technologických faktorech. Poslední skupinou jsou tzv. implicitní faktory, které popisují synergické nebo antagonistické vlivy mezi bakteriemi. U čerstvého masa jsou důležité jak vnitřní faktory (počáteční výskyt psychrotrofních bakterií

na povrchu masa, vodní aktivita, hodnota pH a obsah živin), tak i vnější vlivy (skladovací teplota a přítomnost kyslíku).

3.1.1.1 Vnitřní faktory

Maso se řadí mezi potraviny, které podléhají velice rychle kažení. Obsahuje značné množství vody a také živin, které mikroorganismy dokážou lehce využít pro svůj metabolismus. Libová svalovina obsahuje přibližně 75 % vody, 20 % bílkovin, 5 % lipidů, 1 % sacharidů a 1 % vitaminů a minerálních prvků. Vodní aktivita čerstvého masa se pohybuje kolem 0,98, což je hodnota, která umožňuje růst a množení většiny bakterií, které se podílejí na kažení potravin nebo jsou schopné vyvolat alimentární onemocnění (Kameník, 2011). Ačkoli většina mikroorganismů poroste nejlépe při neutrální hodnotě pH, hodnota pH čerstvého masa kolem 5,6 po skončení rigor mortis taktéž vyhovuje nárokům celé řady bakterií (Kerth, 2013). Vyšší pH masa může být způsobeno stresem zvířete, kdy hovoříme o tzv. DFD masu, pro které jsou typické hodnoty pH > 6. Vyšší hodnotu pH má i tuková tkáň ve srovnání s libovou svalovinou.

Maso obsahuje přibližně 0,2 % glukózy a 0,4 % aminokyselin. V tukové tkáni a v mase s vyšší hodnotou pH jsou nižší hladiny bakteriálních živin, což má za následek rychlejší kažení v důsledku rychlého napadení aminokyselin (Borch et al., 1996). To potvrzuje i Kameník (2011), který uvádí, že je-li glukóza přítomná v povrchových vrstvách masa, nedochází k významnější degradaci jiných látek. Jakmile však glukóza přestává být dostupná, bakterie začínají atakovat aminokyseliny. Produkty glukózového metabolismu jsou neškodné, ale porušení aminokyselin má za následek uvolnění amoniaku, aminů a organických sulfidů, které i v malém množství způsobí nežádoucí vůni a chuť (Robertson, 2010). Právě rozklad bílkovin spolu s oxidací lipidů a ztrátou dalších cenných látek je důsledkem chemických změn při procesu kažení masa (Saláková, 2013).

3.1.1.2 Vnější faktory

Na rozdíl od vnitřních faktorů, vnější faktory nejsou závislé na konkrétní potravine. Vnější parametry potravin jsou vlastně vlastnosti prostředí, ve kterém se daná potravina nachází. Tyto vlastnosti ovlivňují jak samotnou potravinu, tak i růst a množení mikroorganismů (Kerth, 2013).

Nejdůležitějším z faktorů, které ovlivňují mikrobiální růst, je teplota. Teplota je primární vnější faktor, který se přísně kontroluje. To je patrné z většiny HACCP systémů pro masnou výrobu, kde teplota představuje jeden z kritických kontrolních bodů (McDonald and Sun, 1999). Proto ihned po jatečném opracování musí být maso vychlazené, aby se zabránilo jeho zkáze. V Evropské unii se požaduje, aby maso bylo zchlazeno na teplotu pod 7 °C, pro jeho delší údržnost je však třeba ho uchovávat při teplotách kolem 0 °C (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2012). Podle Robertsona (2010) je minimální teplota, při které může být svalová tkáň skladována po neurčitou dobu bez mrazírenských teplot, $-1,5 \pm 0,5$ °C. Většina bakteriální flóry chlazeného masa se však skládá z psychrotrofních bakterií, které mají minimální teplotu potřebnou k růstu -3 °C nebo nižší. Je tedy zřejmé, že bakterie, které se podílejí na kažení, budou na mase růst a nakonec způsobí jeho úplné zkažení. Snížením skladovací teploty lze však prodloužit údržnost masa a alespoň omezit růst těchto nežádoucích bakterií. Při teplotách skladování masa 0; 2 a 5 °C je jeho údržnost 70 %; 50 % nebo 30 % ve srovnání s masem uchovávaným při -1,5 °C (Kameník, 2011). Kritickým bodem, který má významný vliv na kvalitu a bezpečnost masa, je přeprava od okamžiku nákupu produktu konzumentem do jeho domácnosti (Nychas et al., 2008). Podle Kameníka (2011) je tato fáze prakticky nekontrolovatelná a může během ní docházet ke kolísání teplot v závislosti na teplotě vnějšího prostředí. Důsledkem může být omezení údržnosti oproti lhůtám uvedeným zpracovatelem.

Jedním z vnitřních faktorů, které ovlivňují růst mikroorganismů je i oxidačně - redukční potenciál. Tento potenciál může být ovlivněn vnějšími faktory atmosférických podmínek nebo přítomností (či absencí) určitých plynů v prostředí. Například přítomnost kyslíku v atmosféře může zcela jistě ovlivnit schopnost růstu a množení anaerobních mikroorganismů. Rovněž některé modifikované atmosféry, jako je například ozon, nebo oxid uhličitý, které se používají při balení masa, mohou inhibovat růst některých mikrobů (Kerth, 2013).

3.1.1.3 Implicitní faktory

Interakce mezi bakteriemi jsou v mase velmi důležité. Kromě toho soutěž o živiny, výroba antimikrobiálních látek, jako je peroxid vodíku, kyselina mléčná a bakteriociny jsou zásadní pro výběr rostoucí mikroflóry. Příkladem mohou být některé bakterie mléčného kvašení, které tyto produkty látkové výměny vytvářejí (Borch et al., 1996). Kameník (2011) uvádí, že antagonistických účinků vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení se využívá při

aplikaci tzv. ochranných kultur. Jejich působení je založené na produkci bakteriostatických a baktericidních látek, které zabránuje množení kontaminující mikroflóry.

3.1.2 Projevy kažení masa

Trvanlivost masa je možné definovat jako dobu skladování masa až do jeho znehodnocení. Samotný bod kažení pak vyjadřuje určitou maximální přijatelnou bakteriální úroveň či již nepříjemný zápach nebo změnu vzhledu masa (Borch et al., 1996). Je dobře známo, že glukóza, kyselina mléčná a aminokyseliny následované nukleotidy, močovinou a ve vodě rozpustnými bílkovinami, jsou katabolizovány téměř všemi bakteriemi, které tvoří mikroflóru masa. Tyto látky jsou nepostradatelným zdrojem energie pro masivní růst mikroorganismů, a to i přes jejich zanedbatelné množství ve srovnání s proteiny. Je dokázáno, že skutečná koncentrace těchto látek může ovlivnit typ (např. sacharolytické, proteolytické) a rychlost kažení. Kromě toho se tyto látky zdají být hlavním prekurzorem metabolitů, které vnímáme jako kažení (Nychas et al., 2008).

3.1.2.1 Lipidy

Oxidace lipidů je jednou z hlavních příčin zhoršení kvality masa a masných výrobků při skladování a mrazení. Ve většině případů způsobuje oxidace lipidů pokles akceptovatelnosti masa a masných výrobků konzumentem, avšak u některých produktů vede naopak ke zlepšení kvality (např. u trvanlivých masných výrobků a sušených šunek). Všeobecně však oxidační proces výrazně snižuje nutriční hodnotu lipidů. Mohou být znehodnoceny biologicky aktivní složky a v některých případech mohou vznikat i toxické a karcinogenní látky (Saláková, 2013). Znehodnocení tuků (žluknutí) spočívá v reakci nenasycených mastných kyselin s atmosférickým kyslíkem. Autokatalytická oxidace neboli autooxidace nenasycených tuků zahrnuje komplexní sérii reakcí. Proces je iniciovaný tvorbou volného radikálu, který může reagovat s molekulárním kyslíkem za tvorby hydroperoxidů a dalších radikálů podněcujících řetězovou reakci. Propagace řetězce končí, když volné radikály reagují za vzniku stabilních koncových produktů. Výsledkem je tedy štěpení nenasycených mastných kyselin a produkce aldehydů, ketonů a mastných kyselin s krátkým řetězcem (Brown, 1982). Kerth (2013) dodává, že produkty oxidace mají specifický efekt na sensorické vlastnosti masa. Nežádoucí vjemy připomínající rybí či travnatý zápach produkují právě těkavé látky vzniklé v průběhu oxidace, nejvíce však aldehydy.

Oxidaci lipidů často předchází tzv. hydrolýza tuků. Nezbytnou podmínkou hydrolýzy je přítomnost vody a enzymů lipáz (nativních nebo mikrobiálních). Enzymová hydrolýza je nazývána lipolýzou a je řízena lipázami a fosfolipázami. Lipázy nalezneme v kůži, krvi a tkáních zvířat (Saláková, 2013). Avšak i mnoho bakterií, mezi ně patří například pseudomonády, jsou známé produkcí lipolytických enzymů. Stanovení lipolytické aktivity vyžaduje extrakci volných kyselin, které jsou stanoveny pomocí titrace. A ačkoli mohou volné kyseliny způsobit žluknutí, jejich efekt je malý, pokud je srovnáme s oxidačními produkty. Navíc lipolytická aktivita způsobená mikroorganismy má pravděpodobně menší význam při kažení masa než jaký dosahuje v jiných potravinách, kupříkladu v mléčných výrobcích. Produkce extracelulárních lipolytických enzymů je totiž zpravidla inhibována v průběhu využívání sacharidového substrátu, a tak se mikrobiální atak na lipidy zpozdí do doby, než dojde k vyčerpání glukózy z povrchu masa (Brown, 1982). Podle Kameníka (2011) je obsah glukózy v mase kritický faktor určující vztah mezi rozvojem mikroflóry způsobující kažení masa a dobou, kdy se objevuje počátek kažení. Koncentrace glukózy v mase s normální hodnotou pH se pohybuje mezi 100 a 1000 $\mu\text{g/g}$. Senzorické odchylky masa se začínají objevovat, dosáhne-li bakteriální populace počtu kolem 10^8 KTJ/cm² v případě počáteční hladiny glukózy ve svalu přibližně 100 $\mu\text{g/g}$. Je-li však koncentrace glukózy vyšší (1000 $\mu\text{g/g}$), začínají se objevovat změny doprovázející kažení (zápach, osliznutí) při bakteriální populaci 10^9 /cm². Při vysokém pH je hladina glukózy nízká, a tudíž ke kažení dochází již při nárůstu bakterií na hladinu 10^6 /cm².

3.1.2.2 Dusíkaté látky

Potencionálně největší zdroj uhlíku a dusíku pro růst bakterií obsahují bílkoviny. Během stárnutí masa se z lysozomů uvolňují proteolytické katepsiny, které atakují sarkoplazmatické i strukturní bílkoviny. Tím se postupně zvyšuje obsah volných aminokyselin, který však závisí na druhu svaloviny a skladovacích podmínkách (Brown, 1982). Aminokyseliny mají značný vliv na organoleptické vlastnosti potravin, především na jejich chuť. Reakcí aminokyselin pak vznikají různé produkty, které jsou často známými vonnými, chuťovými a barevnými látkami. Ve většině potravin se nachází přibližně 99 % aminokyselin vázaných v bílkovinách a peptidech, zbytek tvoří volné aminokyseliny. Proto je obsah volných aminokyselin vhodným ukazatelem kažení masa. Jako indikátor kažení drůbežního masa lze použít koncentrace těchto volných aminokyselin: glutamin, alanin, arginin, valin, metionin, tryptofan, fenylalanin, izoleucin, leucin, prolin (Saláková, 2013).

To, zda se bude obsah aminokyselin v důsledku mikrobiální činnosti zvyšovat nebo snižovat, záleží hlavně na složení bakteriální flóry (Brown, 1982). Mnoho bakterií produkuje proteázy, obecně gram-negativní bakterie v chlazeném masu převážně vylučují aminopeptidázy (Alexandrakis et al., 2012). Brown (1982) potvrzuje, že k degradaci proteinů je zapotřebí, aby bakterie vylučovala extracelulární proteolytický enzym. Rozpustné sarkoplazmatické proteiny jsou pravděpodobně počátečním substrátem pro proteolytický útok, a až později dochází k degradaci strukturních proteinů. Využívání volných aminokyselin přispívá k zvýšené tvorbě amoniaku (Alexandrakis et al., 2012). Amoniak je koncový produkt degradace dusíkatých látek. Maso ho běžně obsahuje množství, která jsou pro člověka zcela bezpečná. Množství amoniaku se v průběhu skladování zvyšuje, a to právě díky biodegradaci složek a enzymatickým reakcím (Saláková, 2013). Kromě amoniaku patří mezi vedlejší produkty využití aminokyselin také sulfidy, indol, skatol a aminy (Alexandrakis et al., 2012).

Biogenní aminy jsou základní dusíkaté sloučeniny vznikající převážně dekarboxylací aminokyselin nebo transaminací aldehydů a ketonů. Řadí se mezi látky s nízkou molekulovou hmotností, které jsou syntetizovány mikrobiálním, rostlinným nebo živočišným metabolismem. Chemická struktura biogenních aminů může být buď alifatická (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatická (tyramin, fenylethylamin) nebo heterocyklická (histamin a tryptamin). Přestože jsou některé biogenní aminy, jako histamin, tyramin a putrescin potřebné k mnoha funkcím v lidském organismu, konzumace potravin s vysokým obsahem těchto látek může působit toxicky. Mezi nejznámější alimentární otravy patří otravy histaminem. Putrescin a kadaverin zase mohou reagovat s dusitany za vzniku heterocyklických karcinogenních sloučenin, tzv. nitrosaminů (Silla Santos, 1996).

3.1.2.3 Hemová barviva

Vzhled masa velmi ovlivňuje rozhodnutí zákazníka o nákupu. Všeobecně je u červených mas upřednostňována jasně červená svalová tkáň, naproti tomu u kuřecího masa je preferováno bílé a jasné maso i kůže. Barva svalové tkáně je stanovena pomocí obsahu pigmentových sloučenin myoglobinu a hemoglobinu (Robertson, 2010). Hemoglobin i myoglobin jsou složeny z bílkovinného nosiče (globinu) a barevné skupiny (hemu). Hemoglobin na rozdíl od myoglobinu nepatří mezi sarkoplazmatické bílkoviny svalů, ale je ve svalu přítomen ve formě erytrocytů zbytkové krve v jemných vlásečnicích. Jeho podíl je závislý na stupni vykrvení (Saláková, 2013). Hovězí, koňské maso a zvěřina jsou vzhledem k vysokému obsahu hemových barviv tmavé, naopak velmi světlé je maso drůbeže a ryb.

Případné změny barvy masa souvisejí s reakcemi na atomu železa. Buď dochází k vazbě (donor-akceptorovou vazbou) některých molekul na tento centrální atom, bez toho aby došlo ke změně valence železa, nebo dochází k oxidaci na trojmocnou formu (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2012). Hemoglobin a myoglobin mohou reagovat pouze s malými ligandy, např. s kyslíkem. V případě absence kyslíku se myoglobin vyskytuje ve svalové tkáni v podobě deoxymyoglobinu, který je mdlé, purpurové barvy. Naopak je-li myoglobin vystaven kyslíku, dochází k jeho okysličení a k tvorbě jasně červeného oxymyoglobinu. Jestliže je v atmosféře obsažen oxid uhelnatý vytvoří se stabilní, třešňově červený karboxymyoglobin. Hemové železo může být také oxidováno ze železnatého do železitého stavu za tvorby hnědého metmyoglobinu (Robertson, 2010). K tomu dochází při delším skladování masa, hlavně v důsledku vzájemného působení hemových barviv a tuků, kdy obě složky podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem. Hlubší rozpad hemových barviv nastává působením peroxidu vodíku nebo sulfanu, vytvořených činností mikroorganismů (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2012). Bakteriální produkce sirovodíku přeměňuje svalové pigmenty na zelený sulfmyoglobin. Zelenání je obvykle spojeno s vysokým pH masa, ale může k němu dojít i za normálního pH (Borch et al., 1996).

3.1.3 Patogeny

Svalová tkáň ze zdravého zvířete neobsahuje bakteriální a virové patogeny. Stejně jako v případě organismů způsobujících kažení, jsou patogeny umístěny na povrch masa během výroby a manipulace s čerstvým masem. Rozlišujeme tři potencionální zdroje kontaminace patogeny. Kontaminace spojovaná se zvířaty, kdy mohou být patogeny přeneseny na maso z kůže, peří a vnitřností během zpracování na jatkách. Dále jsou to patogeny přenášené lidmi, především personálem během manipulace s produktem. Oba zdroje patogenů mohou následně kontaminovat výrobní vybavení a nářadí, které pokud nebude adekvátně vyčištěno a dezinfikováno, může sloužit nejenom jako přenašeč patogenů, ale také jako samotný zdroj kontaminace (Robertson, 2010).

Podle Doulgeraki et al. (2012) se nejčastěji na čerstvém mase vyskytují bakterie rodu *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bakterie mléčného kvašení a různé rody čeledě *Enterobacteriaceae*. Vlivem prostředí se na bakterie vytváří jakýsi selekční tlak. Ty, které jsou lépe adaptovány na dané prostředí, přerůstají ostatní, stávají se dominantnějšími a dosahují tak většího počtu. Proto přežití, růst a pořadí mohou být, pro specifické bakterie

způsobující kažení, ovlivněny diverzitou ekofyzilogických faktorů ve fyzikálním či chemickém prostředí. Tyto faktory, včetně složení masa, teploty, pH, kyslíku nebo oxidu uhličitého (obalová atmosféra) a konkurenční mikroflóry, jsou důležité k zachování kvality masa.

3.1.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli tvoří krátké, pohyblivé, Gram negativní tyčinky. Je schopná fermentace laktózy a sacharózy za tvorby kyseliny a plynu, čímž se odlišuje od velmi podobných salmonel. Jednotlivé druhy obývají střevní trakt různých živočichů. Nepatogenní kmeny *E. coli* se nachází ve spodní části střevního traktu člověka a teplotokrevných zvířat, je tedy přítomná i ve výkalech. Její přítomnost ve vodách nebo v potravinách je ukazatelem fekálního znečištění. Často ji nalezneme v potravinářských surovinách, které byly v kontaktu s hnojenou půdou. Přítomnost *E. coli* ve vodě nebo v potravině ukazuje, že stejným způsobem se do tohoto prostředí mohou dostat i patogenní střevní bakterie (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2009). Infekce z masa byla většinou spojena se střevní patogenní *E. coli*. V poslední době však bylo prokázáno, že *E. coli* pocházející ze živočišných surovin, může být původcem i mimostřevní infekce, jako je například infekce močových cest (Hammerum and Heuer, 2009). Podle Bardoně (2008) je *E. coli* schopna vyvolat celou škálu onemocnění např. sepse, infekce ran, hnisavé procesy, infekce zažívacího traktu, hemolyticko-uremický syndrom (HUS). Z hlediska alimentárních infekcí mají význam kmeny, které produkují určité toxiny.

Enterické kmeny *E. coli* jsou klasifikovány na základě virulentních vlastností na enterotoxigenní, enteropatogenní, enteroinvazivní, enterohemoragické a verotoxinogenní *E. coli*. Všechny tyto kmeny jsou původci průjmů (Hammerum and Heuer, 2009). Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) způsobuje nemoc zvanou „cestovní průjem“, rozšířenou po celém světě. ETEC kmeny produkují dva typy enterotoxinů: termolabilní toxin inaktivovaný při teplotě 60 °C za 30 minut a termostabilní toxin rezistentní do 100 °C po dobu 15 minut. ETEC kmeny způsobují řadu epidemií po požití různých potravin (červeného masa, drůbeže, bramborové kaše, mléka a sýrů) a vody. Inkubační doba je přibližně 44 hodin. Mezi typické příznaky patří křeče v břiše, zvracení a průjem. Druhá skupina jsou enteropatogenní *E. coli* (EPEC), které jsou příčinou průjmu u dětí. Tvoří jeden i více cytotoxinů. Do třetí skupiny patogenních *E. coli* řadíme enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), které produkují enterotoxin a často způsobují další nemoci, např. zánět tlustého střeva, dysenterie spojené s horečkami a krvavou stolicí. Rizikové mohou být v tomto případě sýry, mléko a maso. Čtvrtou skupinu tvoří

enterohemoragické *E. coli* (EHEC), které vytvářejí také řadu cytotoxinů a způsobují hemoragický zánět slepého střeva, hemoragicko-uremický syndrom, končící smrtí u mladých a starších pacientů (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2009). V rámci monitoringu zoonóz se v Evropě sledují tzv. verotoxinogenní kmeny *E. coli* (VTEC). Především pak *E. coli* O157, které jsou původci hemolyticko-uremického syndromu, hlavně u dětí (Bardoň, 2008). Klíčovými faktory patogenity *E. coli* O157 a dalších EHEC je jejich schopnost napadnout střevní stěnu a odtud produkovat silný verotoxin. Verotoxin je také známý pod názvem shigatoxin, a to z důvodu podobnosti s toxinem, který produkuje bakterie *Shigella*, která způsobuje dysenterii. Z toho důvodu jsou kmeny O157 také známé jako shigatoxigenní *E. coli* nebo STEC (Mead, 2007). V roce 2008 bylo v Evropské unii hlášeno 3159 potvrzených případů VTEC. Více než polovina (53 %) těchto případů byla způsobena sérologickou skupinou *E. coli* O157 (EFSA, 2010).

Na začátku května roku 2011 vypukla v Německu velká epidemie hemoragických kolitid a hemolyticko-uremického syndromu, vyvolaná shigatoxigenním kmenem *E. coli* O104:H4. Tento vysoce virulentní kmen v sobě spojuje vlastnosti enteroagregativních a enterohemoragických *E. coli*. Bylo zaznamenáno 4055 postižených, 885 (21,8%) s těžkým průběhem nemoci, tj. s hemolyticko-uremickým syndromem a 48 (1,2 %) případů úmrtí. Jedná se o druhou největší epidemii vyvolanou STEC na světě a největší co do počtu pacientů s hemolyticko-uremickým syndromem. Další zvláštností je, že v dosavadní historii onemocnění hemolyticko-uremickým syndromem obvykle postihovalo nízké věkové skupiny, nebo starší lidi a pacienty s oslabenou imunitou. V této epidemii se jednalo především o střední věkové skupiny, a především o ženy (Marejková a kol., 2011).

3.1.3.2 Rod *Salmonella*

Salmonely jsou krátké, pohyblivé, Gram negativní, nesporulující tyčinky. Bakterie jsou fakultativně anaerobní a je pro ně typické zkvašování glukózy za vzniku kyseliny a plynu či neschopnost metabolizovat laktózu a sacharózu, čímž se i odlišují od dalších Gram negativních tyčinek patřících do čeledi *Enterobacteriaceae*. Optimální teplota pro růst salmonel se pohybuje kolem 38 °C. Buňky těchto bakterií jsou poměrně citlivé vůči vyšším teplotám. Pro jejich zničení plně dostačuje teplota 60 °C po dobu 15–20 minut. Teploty pod 7 °C inhibují jejich růst. Rod *Salmonella* zahrnuje více než 2300 různých sérovarů (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2009). Sérovary způsobující salmonelózu se mohou geograficky lišit, avšak nejčastěji se jedná o *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. agona*,

S. newport, *S. infantis*, *S. panama*, *S. saintpaul* a *S. weltevreden* (Uyttendaele et al., 1998). Jeden za sérovarů je obzvlášť důležitý. Za posledních 20 let totiž dochází téměř ve všech částech světa k pandemické infekci, na které se podílí *S. enteritidis* (Humphrey and Jørgensen, 2006). To potvrzují i Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol. (2009), kteří píší, že nejrozšířenějším sérotypem salmonel v České republice je *S. enterica* ser. *Enteritidis*. Vyšší četnost vykazuje také *S. enterica* ser. *Typhimurium*. *S. typhimurium* je zodpovědná za velmi závažné střevní onemocnění lidí, tzv. břišní tyfus.

Výskyt salmonel je v chovech drůbeže sledován v rámci programů tlumení salmonel od roku 2007. Programy byly postupně zaváděny u jednotlivých kategorií drůbeže a od roku 2010 probíhaly v reprodukčních i produkčních hejnech masné i nosné linie kura domácího a v chovech krůt. V nosné linii kura domácího je tlumení salmonel úspěšné; rodičovská hejna byla v roce 2012 zcela bez záchyťů salmonel a v chovech nosnic pro konzumní vejce se frekvence záchyťů salmonel snižuje. Naopak v masné linii kura domácího nebyla situace uspokojivá ani v rodičovských hejnech ani ve výkrmu. Nárůst prevalence *S. enteritidis* má více příčin. V první řadě se uplatňuje vertikální přenos z infikovaných reprodukčních chovů, kdy zdrojem infekce jsou dodávky jednodenních kuřat z domácích i zahraničních líhní. Dalším možným zdrojem salmonel je kontaminace krmiva. Výrazný vliv na výskyt salmonel v prostředí chovu má úroveň biologické bezpečnosti a s ní související horizontální přenos v hospodářství prostřednictvím hlodavců, hmyzu, personálu a při nevhodném zacházení s podestýlkou. Proto je velmi důležité dodržování pravidel biologické bezpečnosti, tzn. zásad zoohygieny a sanitace. Možný dopad nedodržení těchto zásad na výskyt původců nákaz jsou stále ještě chovateli podceňovány (Dubská a kol., 2013).

Salmonella spp. jsou zodpovědné za alimentární otravy, pro něž jsou typické příznaky, jako zvracení, průjem a zvýšená teplota. Jednotlivé příznaky se pak liší svojí závažností, od mírných bolestí břicha trvajících 1-2 dny, až po extrémně závažné případy vedoucí k vysílení a dehydrataci organismu způsobujících případně i smrt (Brown, 1982). Hlavními zdroji salmonel jsou vejce, vaječné výrobky, hlavně cukrářské a lahůdkářské, dále pak i nedostatečně tepelně opracované maso a masné výrobky (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2009). Bardoň (2008) uvádí, že výsledky monitoringu zaměřené do počátečních segmentů potravinového řetězce (jatečná zvířata), ale i běžných potravin ukazují, že prevalence salmonel zde není tak vysoká, jak by naznačovala incidence v lidské populaci. Je zřejmé, že výskyt onemocnění u spotřebitelů je umocněn nesprávným nakládáním a manipulací spotřebitele se surovinami a potravinami. Podle údajů SZÚ (2016) bylo v České republice v roce 2015 hlášeno 12739 případů onemocnění salmonelózou, což je méně než

v roce 2014, kdy bylo hlášeno 13633 případů. Zároveň jsou však tyto údaje vyšší ve srovnání s lety 2008 až 2013, kdy byly nejvyšší počty nálezů hlášeny v roce 2008, a to 11009 případů tohoto infekčního onemocnění. Ve stejném roce, tedy roce 2008, bylo podle EFSA (2010) v Evropské unii hlášeno 131468 případů salmonelózy u lidí. Z větší části byly potíže způsobené sérovarem *S. enteritidis*.

3.1.4 Moderní konzervační metody

Konzervace potravin zahrnuje opatření přijatá k zachování potravin s požadovanými vlastnostmi a povahou tak dlouho, jak je to jen možné (Rahman, 1999). Metody konzervace masa mohou být rozděleny do tří širokých kategorií založených na kontrole teploty, vlhkosti a na inhibičních postupech (baktericidních a bakteriostatických, jako je ionizující záření nebo balení). Samotný způsob konzervace však může zahrnovat hned několik antimikrobiálních postupů. Každý kontrolní krok tak můžeme považovat za „překážku“ pro bakteriální růst a v případě, že využijeme kombinaci různých postupů (jinak zvaných překážková technologie), mohou být navrženy tak, aby bylo dosaženo potřebných cílů k zajištění jak mikrobiální, tak i organoleptické kvality (Zhou et al., 2010). To potvrzují i Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol. (2012), kteří píšou, že ve výrobě potravin stále vzrůstá trend tzv. minimálního opracování. Čerstvé nebo minimálně opracované potraviny se vyznačují tím, že při jejich konzervaci není použita absolutní metoda konzervace, např. sterilace v hermeticky uzavřeném obalu. Úchova těchto potravin je dána kombinací několika konzervačních postupů, které samotné nestačí na stabilizaci, ale společně vytvářejí systém bariér (překážek) proti růstu mikroorganismů.

Konzumenti však stále více požadují vysoce kvalitní, praktické, novátorské a bezpečné masné produkty s přírodním aroma, chutí a prodlouženou trvanlivostí. Kromě toho žádají výrobky i méně slané, méně okyselené a bez chemických konzervantů. Pro splnění všech těchto požadavků bez ohrožení bezpečnosti se produkce a výroba masných produktů nachází ve fázi inovativní dynamiky, kdy se zabývá problematikou rozvíjení a implementace alternativních technologií jako jsou bezzářevové technologie nebo alternativní, rychlejší i senzoricky šetrnější zářevové technologie. (Aymerich et al., 2008). K nejvíce prozkoumaným konzervačním technologiím řadíme inaktivační technologie, jako je vysoký hydrostatický tlak, nové obalové systémy typu modifikované atmosféry a aktivního balení, přírodní antimikrobiální sloučeniny a biokonzervanty. Všechny tyto alternativní technologie se snaží být šetrné, energeticky úsporné, ohleduplné k životnímu prostředí a garantují

přirozený vzhled potravin. Jejich hlavní úkolem však zůstává eliminace patogenů a mikroorganismů způsobujících kažení (Zhou et al., 2010).

3.1.4.1 Vysokotlaké ošetření

Konzervace vysokým tlakem je metoda ošetření, která spočívá ve vystavení potravině účinku vysokého tlaku (až 1000 MPa) po dobu několika minut, při kterém dojde, bez nutnosti záhřevu, k usmrcení mikroorganismů (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2012). K inaktivaci mikroorganismů dochází bez senzorických změn nebo pozměnění nutričních vlastností potravin. Výroba tlaku se uskutečňuje v ocelovém válci, který obsahuje kapalně médium, např. vodu, přičemž vzorek je chráněn před přímým kontaktem pomocí dobře utěsněného obalu (Zhou et al., 2010). Přes uvedenou šetrnost většiny zákroků může ošetření vysokým tlakem vést ke ztrátě barvy masa, jelikož působení tlaku nad 300 MPa vyvolává denaturaci myoglobinu (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2013). Avšak v porovnání s hovězím a vepřovým masem, drůbeží svalovina nemění tolik svůj vzhled, a to především díky nižšímu obsahu myoglobinu (Zhou et al., 2010). Účinek inaktivace závisí na typu mikroorganismu a jeho růstové fázi, aplikovaném tlaku, času, složení potravin, teplotě, pH a vodní aktivitě. Obecně jsou Gram-negativní bakterie a buňky v růstové fázi více citlivé než Gram-pozitivní bakterie a buňky ve fázi stacionární. Některé mikrobiální spory potřebují ošetření větší než 1000 MPa. Eukaryotní vegetativní formy hub a kvasinek jsou inaktivovány tlakem 200 až 300 MPa, zatímco jejich spory potřebují ošetření tlakem 400 MPa (Aymerich et al., 2008). Stejnou odolnost vůči tlaku jako mají některé spory bakterií, mají i viry. Inaktivační účinek tlaku roste s teplotou, je zvyšován přítomností chemických konzervačních látek (jako např. přídavku kyseliny sorbové, benzoové, ethanolu, extraktů z koření, lysozymu a dalších látek) (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2013).

3.1.4.2 Ionizační záření

Účinky záření na buňky, jak prokaryotické a eukaryotické, jsou známy již více než sto let. Teprve však ve druhé polovině 20. století vešla tato technika v pozornost jako možný nástroj pro bezpečnost potravin (Kerth, 2013). Ke konzervaci se používá UV záření (má malou energii, malou pronikavost, usmrcuje mikroorganismy jen na povrchu, podporuje oxidační procesy), dále β -záření, tzv. elektronové, a ionizující χ -záření (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2012). Elektronové záření se však využívá pouze k povrchovému ošetření

potravin, protože emise elektronů je málo pronikavá (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2013).

Ionizující záření je metoda přímé inhibice mikroorganismů využívaná pro konzervaci masa od roku 1940. Výhodami ionizujícího záření při konzervaci potravin jsou vysoce účinná inaktivace bakterií i skutečnost, že produkt je v podstatě chemicky nezměněný. Výhodou je i možnost ošetřit silnější vrstvu potravin, která může být ošetřena až po zabalení do obalu (Zhou et al., 2010). Účinek záření se hodnotí podobně jako vliv záhřevu, kritériem je dávka energie vnesená zářením (1kGy odpovídá absorpci 1kJ/kg potravin) (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2012). Obecně jsou ionizujícímu záření nejvíce odolné viry, následované sporami a kvasinkami. Plísně a Gram-pozitivní vegetativní bakterie jsou pak více rezistentní než Gram-negativní bakterie. V potravinářství je ozáření definováno dvěma procesy. Jedním je radiační pasterizace, což je inaktivace nesporulujících bakterií s nízkým požadavkem na absorbovanou dávku (1 -10 kGy) a druhým je sterilizační ozáření používané k zajištění eliminace *Clostridium botulinum* (Aymerich et al., 2008). K inaktivaci spor je zapotřebí vyšších dávek až 35 a více kGy (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2012). Většinou jsou doporučovány maximální dávky 15 kGy, průměrná dávka záření 10 kGy nepředstavuje žádné zdravotní riziko, ani není nebezpečná ve vztahu k sensorickým a nutričním vlastnostem většiny potravinářských materiálů (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2013). Pomocí ionizace se tak účinně kontroluje přítomnost všech hlavních patogenů v potravinách typu *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. (Aymerich et al., 2008). Změna barvy ozářeného masa může nastat v důsledku vlastní náchylnosti molekuly myoglobinu na přívod energie a změn v chemickém prostředí. Hemové železo je obzvláště náchylné. Barvu masa během procesu ozařování je možné zlepšit různými kombinacemi metod, např. krměním dobytka krmivem obohaceným o antioxidanty, vhodnými podmínkami pro uchování masa před ozářením (pH, oxymyoglobin vs. metmyoglobin), přidáním antioxidantů přímo do výrobku, přítomností ochranných atmosfér, kontrolou balení a teploty. Radiační ošetření nevede ke zničení thiaminu, což je jeden z nejméně stabilních vitaminů. To tedy svědčí o tom, že ozáření nemá na tyto živiny žádné škodlivé účinky (Zhou et al., 2010). Naproti tomu lipidy vlivem záření podléhají reakcím podobným autooxidaci, kdy vznikají hydroperoxydy, přičemž dochází k nežádoucím změnám sensorických vlastností. Oxidační změny mohou být zmírněny v případě, že jsou ozařovány potraviny ve zmrazeném stavu. V každém případě není vhodné ozařovat potraviny s vysokým obsahem tuku (Kadlec, Melzoch, Voldřich a kol., 2013).

3.1.4.3 Ochranné balení

Balení chrání potravinu před nežádoucími změnami, jako jsou změny barvy, chuti a vůně, ztráta nutričních vlastností, změny textury, patogenita. Proměnné, které ovlivňují skladovatelnost baleného čerstvého masa, jsou typ produktu, směs plynů, obal, balicí stroje, teplota a aditiva (Zhou et al., 2010). Mezi nejčastěji používané obaly patří vakuové balení a balení v ochranné atmosféře (Mikócziová a Kameník, 2013).

Vakuové balení prodlužuje údržnost více než dvojnásobně oproti skladování v prostředí klasické atmosféry (Budig, 2009). Nejčastějším způsobem vakuového balení je umístění masa do vrstvené fólie v podobě sáčku a vložení do komorového balicího stroje. V něm dochází k odsátí vzduchu a sáček je poté hermeticky uzavřen (Kameník a Chomát, 2013). Vyloučením vzdušné atmosféry dochází k zabránění růstu aerobním bakteriím. Většina z těchto bakterií patří mezi gramnegativní mikroby s výrazným potenciálem ke kažení masa (Mikócziová a Kameník, 2013). Vakuové skin balení pak spočívá v umístění produktu na bariérovou styrenovou nebo polypropylenovou podložku a následném vakuovém utěsnění pomocí bariérové fólie, která se vlivem tepla scvrkne tak, aby odpovídala tvaru produktu (Zhou et al., 2010). Tento postup umožňuje využít vakuum šetrněji. Výhodou je menší množství uvolněné šťávy a delší údržnost v porovnání s klasickým vakuovým balením (Kameník a Chomát, 2013).

Balení do ochranné atmosféry se provádí výměnou atmosféry uvnitř balíčku za směs plynů, které se svým sloužením liší od běžného vzduchu. Tento proces je hyperbarický, což znamená, že tlaky jsou vyšší než normální atmosférický tlak. Typické plyny používané při tomto procesu jsou oxid uhličitý, dusík a kyslík (Kerth, 2013). Pro balení drůbežního masa je běžná koncentrace CO₂ ve směsi 20–30 %, 70–80 % připadá na dusík. Koncentrace kyslíku by měla být velmi nízká, maximum je 0,6 % (Kameník a Chomát, 2013).

Oba způsoby ochranného balení, tj. vakuové balení a modifikovaná atmosféra, prodělaly v minulých letech řadu zdokonalení, která vedla k prodloužení trvanlivosti i zvýšení kvality balených výrobků. Většina vylepšení se týkala především zdokonalení bariérových vlastností použitých fólií. Tyto formy balení řadíme mezi tzv. pasivní balení (Kameník a Chomát, 2013). Naproti tomu aktivní balení je inovativní koncept, který můžeme charakterizovat jako balicí systém, ve kterém spolu interagují obal, produkt a prostředí a společně tak mění podmínky balené potraviny, prodlužují trvanlivost a zlepšují bezpečnost potraviny nebo její senzorycké vlastnosti. Mezi hlavní prvky aktivního balení patří pohlcovače kyslíku, systémy kontroly oxidu uhličitého nebo ethylenu, uvolňovače ethanolu

a antioxidantů, pohlcovače vlhkosti a antimikrobiální systémy sloužící ke kontrole růstu některých mikroorganismů (Aymerich et al., 2008).

3.1.4.4 Biokonzervace a přírodní antimikrobiální látky

Přírodní sloučeniny typu esenciálních olejů, chitosanu, nisinu a lysozymu, jsou zkoumány jako možná náhrada chemických konzervantů. Rozsáhlé studie se zaměřují na prodlužování skladovatelnosti a zvyšování bezpečnosti potravin s využitím přirozené nebo kontrolované mikroflóry, při níž jsou využívány bakterie mléčného kvašení a jejich antimikrobiální produkty jako kyselina mléčná a bakteriociny (Zhou et al., 2010). Ve většině fermentovaných potravin jsou mléčná a octová kyselina, produkované bakteriemi mléčného kvašení, zodpovědné za snížení pH, čímž vlastně potravinu konzervují (Lücke, 2000). Bakteriociny jsou antimikrobiální peptidy nebo proteiny, které se liší v širokém spektru aktivit, způsobu účinku, molekulové hmotnosti, genetickém původu a biochemických vlastnostech (Zhou et al., 2010). Jsou produkovány kmeny všech rodů bakterií mléčného kvašení, které jsou významné pro maso. Bakteriociny působí proti bakteriím, které úzce souvisejí s organismy, které tyto látky produkují. Navíc mnoho bakteriocinů také inhibuje rod *Listeria*, ale jen málo z nich je účinných proti rodům *Clostridium*, *Bacillus* a *Staphylococcus* (Lücke, 2000).

Chitosan je univerzální biopolymer, který má širokou škálu aplikací v potravinářském průmyslu. Vykazuje antimikrobiální aktivitu proti velkému množství mikroorganismů. Za hlavní mechanismus jeho antibakteriálního účinku se považuje účinek na membránovou permeabilitu a vazba stopových prvků (Kanatt et al., 2008). Podle Zhou et al. (2010) je zvláště slibná jeho účinnost v kombinaci s dalšími antimikrobiálními látkami.

I mnoho rostlin obsahuje látky, které mají antimikrobiální aktivitu a jsou souhrnně označovány jako tzv. „zelené chemikálie“. Koření a byliny jsou známé díky své schopnosti inhibovat bakterie, kvasinky a plísňe, a proto jsou tradičně používány při konzervaci potravin i pro medicínské účely (Rahman, 1999).

3.2 Silice

Silice, nebo také éterické, aromatické a těkavé oleje, jsou produktem sekundárního metabolismu rostlin, během kterého dochází k degradaci látek metabolismu primárního, tedy cukrů, tuků a bílkovin (Růžičková, 2002). Tyto rostlinné látky jsou většinou spojovány s kořením a bylinami, avšak mohou být také izolovány z ovoce, kořenů a ze stonků rostlin. Některé silice a izolované rostlinné sloučeniny jsou využívány v potravinách jako ochucovadla. Podle funkcí, které v rostlině plní, mají tyto sloučeniny široký okruh zajímavých biologických aktivit. Bylo prokázáno, že některé látky působí jako atraktanty pro hmyz a lákají ho k opylování rostliny, zatímco další fungují opačně a vykazují repelentní aktivitu. Dalším důvodem ke tvorbě silic může být i snaha rostlin o přilákání býložravců, kteří pak slouží jako přenašeči semen nebo snaha o potlačení infekce způsobené rostlinnými patogenními mikroorganismy. Sloučeniny, které jsou schválené pro používání v potravinářství a které kombinují antimikrobiální aktivitu s nízkou toxicitou, mají velký potenciál k tomu, aby byly použity jako přírodní konzervanty pro potraviny (Rahman, 1999).

3.2.1 Historie silic

Historie produkce těkavých olejů je stará jako civilizace sama. Se silicemi a ostatními aromatickými látkami se obchodovalo hlavně ve starověkém Egyptě, Mezopotámii a Indii. Dodnes nejsou příliš známy tehdejší výrobní postupy. Arabové udělali mnoho pokroků v chemii přírodních léčiv, ale je pravděpodobné, že rozšíření používání mnohých materiálů se neobjevilo do doby procitnutí zájmu o chemii léčiv ve středověké Evropě. Ačkoli byla destilace používána po mnoho století, plný rozvoj destilačních technik nastal až po 13. století ve Španělsku (Růžičková, 2002). První věrohodná písemná zpráva o destilaci silic je připisována katalánskému lékaři Villanova (1235–1311). Během 13. století byly silice vyráběny v lékárnách a jejich farmakologické účinky byly popsány v lékopisech. Přesto jejich používání nebylo v Evropě dostatečně rozšířeno, a to až do 16. století. Od této doby se silicemi začíná obchodovat hlavně v Londýně. Ve stejném století publikují zcela nezávisle na sobě svá díla dva lékaři ze Štrasburku, Brunschwig a Reiff, kteří se zmiňují pouze o malém množství silic, jako je terpentín, olej z jalovce, rozmarýnu, levandule, hřebíčku, muškátového květu i oříšku, ale popisují také anýz a skořici. Podle francouzského lékaře Du Chesne (Quercetanus) byla v 17. století dobře známá příprava silic a lékárny obvykle disponovaly množstvím 15-20 druhů různých silic. Použití oleje z čajovníku (tzv. tea tree oil)

pro medicínské účely se datuje od dob kolonizace Austrálie na konci 18. století, avšak je dosti pravděpodobné, že byl tento olej používán již daleko dříve australskými domorodci. Říká se, že první měření bakteriálních vlastností par esenciálních olejů bylo uskutečněno v roce 1881 De la Croixem. Avšak v průběhu 19. a 20. století ustupuje využívání silic v lékařství do pozadí a pozornost získávají tyto látky především díky své chuti a aromatu (Burt, 2004). Prvním střediskem pro aromatické rostliny specializované na výrobu parfémů (jasmín, pomerančové květy) a růžového oleje se stalo Grasse v jižní Francii (Růžičková, 2002).

První systematické zkoumání složek silic lze přičíst francouzskému chemikovi M. J. Dumasovi (1800–1884), který analyzoval některé uhlovodíky a kyslík, stejně tak i složky obsahující síru a dusík. Svoje výsledky zveřejnil v roce 1833. Další francouzský vědec M. Berthelot (1859) charakterizoval několik přírodních látek a jejich produkty pozměněné optickou rotací. Nicméně nejdůležitější výzkumy prováděl O. Wallach, který byl v té době asistentem F. A. Kekuleho. Byl to právě on, kdo si uvědomil, že některé terpeny, které byly často pojmenované podle svých rostlinných zdrojů, bývají chemicky identické. Pokusil se tedy izolovat jednotlivé složky silic a zabýval se studiem jejich základních vlastností. V této době již byly známé uhlovodíky s molekulárním vzorcem $C_{10}H_{16}$, které byly podle Kekuleho pojmenovány terpeny, z důvodu jejich výskytu v terpentýnovém oleji. V letech 1884–1914 napsal Wallach okolo 180 článků, které shrnul ve své knize *Terpene und Campher*, kde popisuje všechny dosud známá fakta o terpenech. Již v roce 1887 naznačil, že terpeny musí být sestaveny z izoprenových jednotek. V roce 1910 byl oceněn Nobelovou cenou za chemii “jako uznání za jeho vynikající výzkum v organické chemii, a to zejména v oblasti alicyklických sloučenin”. Německý chemik A. von Baeyer byl laureátem Nobelovy ceny v roce 1905. Věnoval se struktuře a vlastnostem cyklických terpenů a organickým barvivům. O objasnění struktury terpenů se zasloužil také L. Ružička, který taktéž získal Nobelovu cenu za chemii i další vědci jako W. Treibs, D. H. R. Barton a v neposlední řadě R. B. Woodward, který ve čtyřicátých letech minulého století využíval k objasnění struktury terpenů i jiných přírodních látek ultrafialovou spektroskopii. I on v roce 1965 dostal Nobelovu cenu za chemii. Nicméně téměř exponenciální růst znalostí v oblasti silic je patrný během posledního půl století, a to především díky rozvoji analytických metod (Baser and Buchbauer, 2010).

3.2.2 Výskyt silic

Silice jsou rostlinné sekundární metabolity, které jsou biosyntetizovány v žláznatých strukturách rostlinných buněk (Bajpai et al., 2012). Hromadí se především v květech, plodech, listech, kůře a kořenech. Jejich obsah v jednotlivých druzích kolísá. Například květy růží, ze kterých se získává růžový olej, jedna z nejdražších silic, obsahují pouze 0,01 % silice. Naopak poupata hřebíčkovce kořeného, známé jako koření hřebíček, obsahují 16–18 % silice. Navíc složení silice v jednotlivých orgánech téhož druhu nebývá stejné. Zatímco například v kůře skořicovníku cejlonského je hlavní složkou silice cinnamaldehyd, tvoří v silici jeho listů nejvýznamnější složku eugenol a v silici kořenů kafr. Odhaduje se, že se na světě vyskytuje asi 350 tisíc odlišných rostlinných druhů. Přibližně 17500 druhů, tj. 5 %, jsou aromatické rostliny. Naproti tomu autoři Baser and Buchbauer (2010) píší, že až 10 % rostlinných druhů obsahuje silice.

Hlavní rostlinné čeledě, ve kterých můžeme najít aromatické rostliny, jsou myrtovité (*Myrtaceae*), vavřínovité (*Lauraceae*), routovité (*Rutaceae*), miříkovité (*Apiaceae*), hluchavkovité (*Lamiaceae*), hvězdnicovité (*Asteraceae*), trávovité (*Poaceae*), zázvorovité (*Zingiberaceae*) a pepřovité (*Piperaceae*) (Růžičková, 2002).

Významné výrobce silic lze nalézt snad na každém kontinentu. V Evropě je centrem výroby oblast kolem Středozevního moře. Ve velkém produkují silice země jako Itálie, Španělsko, Portugalsko, Francie, Chorvatsko, Albánie a Řecko. Kromě těchto přímořských států, patří mezi výrobce silic i východoevropské země, a to například Bulharsko, Rumunsko, Maďarsko a Ukrajina. Rusko se může chlubit obrovským množstvím planě rostoucích rostlin, ale i velkou plochou uměle pěstovaných bylin. Asijský kontinent je díky svému rozmanitému podnebí jedním z nejvýznamnějších producentů těchto rostlinných látek. Čína a Indie hrají v tomto odvětví hlavní roli, následované jsou pak Indonésií, Srí Lankou a Vietnamem. Mnoho jedinečných a neobvyklých silic pochází z australského kontinentu a sousedního Nového Zélandu a Nové Kaledonie. V Africe je produkce silic typická především pro Maroko, Tunisko, Egypt, Alžírsko a Pobřeží slonoviny. Mnoho důležitých druhů koření produkují ostrovy Madagaskar, Komorské ostrovy, ostrov Mayotte a Réunion, které se nacházejí podél východního pobřeží afrického kontinentu. Také americký kontinent je jedním z největších výrobců silic. Země jako Spojené státy, Kanada a Mexiko se pyšní tímto rostlinným bohatstvím. Co se týká Jižní Ameriky, silice jsou vyráběny především v Brazílii, Argentině, Paraguay, Uruguay, Guatemale a na ostrově Haiti (Baser and Buchbauer, 2010).

3.2.3 Způsoby získávání silic

Existuje několik odlišných metod používaných k získávání silic. První metoda spočívá v přípravě odvaru nebo macerátu. Tato metoda by se dala připodobnit k vaření čaje. Byliny jsou umístěny do rozpouštědla, kde se nechají až do doby, kdy se vyextrahuje všechno aroma. Celý proces může trvat krátce, například jeden den, nebo naopak zabere více času, kdy extrakce může trvat i měsíc. Doba extrakce pak závisí na mnoha faktorech, jako jsou velikost bylinných částí, druh rozpouštědla, teplota a mechanické míchání (Hui et al., 2001).

Méně často se silice získávají lisováním suroviny nebo tzv. enfleuráží bezpachým tukem za studena, kdy se nejčastěji používá vepřové sádlo, nebo macerací horkým tukem za tepla. Enfleuráž se vyplatí pouze u vzácných silic, například u jasmínu. Z tuku je poté silice extrahována organickými rozpouštědly (Růžičková, 2002).

Bezpochyby nejčastěji používanou metodou pro extrakci silice z rostlin je destilace vodní parou. Po celém světě se můžeme setkat s různým provedením destilačních závodů. Zatímco v některých rozvojových zemích se stále používají tradiční a někdy poněkud primitivní metody, získané esenciální oleje jsou často vysoké kvality. Industrializované země disponují technologicky vyvinutějším a komplexnějším zařízením, kdy pomocí počítače analyzují finální produkt. Oba způsoby produkce však poskytují vynikající kvalitu silice (Baser and Buchbauer, 2010). Růžičková (2002) uvádí, že destilace vodní parou je postup nejméně šetrný, jelikož se při něm poškozují jemnější složky silice. Četné využívání této metody může souviset s poměrně nízkými náklady. Další využívanou metodou izolace silic je i superkritická fluidní extrakce pomocí oxidu uhličitého.

3.2.4 Chemická struktura silic

Rostlinné silice jsou nízkomolekulární těkavé směsi látek biosyntetizované v různých orgánech rostlin (Bajpai et al., 2012). Mají olejovitý charakter, a proto jsou ve vodě prakticky nerozpustné, nemísí se s ní. Rozpouštějí se však v organických rozpouštědlech. Na vzduchu snadno oxidují a pryskyřičnatí. Silice se za běžných teplot vypařují, těkají s vodními parami a po silném ochlazení nebo po delším stání se z nich vylučují pevné krystalické součásti (Růžičková, 2002).

Chemická povaha těchto látek závisí na složení terpenových sloučenin (mono-, seskvi- a di-terpeny), které jsou většinou ve formě uhlovodíků nebo kyslíkových derivátů. Některé komponenty silic mají dusíkatý nebo sirný charakter, ty jsou nejčastěji součástí alkoholů, kyselin, esterů, epoxidů, aldehydů, ketonů, aminů a sulfidů. Složky silic je možné rozdělit

do dvou skupin na sloučeniny terpenového původu a aromatické sloučeniny (Bajpai et al., 2012). Tvoří se dvěma způsoby, a to mevalonátovou cestou při níž vznikají terpeny a šikimátovou cestou, která dává vzniknout kumarinům a fenolickým látkám (Růžičková, 2002).

Terpeny jsou definovány jako látky složené z izoprenových jednotek (Baser and Buchbauer, 2010). Jejich sloučeniny existují ve formě mono-, seskvi-, hemi-, di-, tri- a tetraterpenů. Monoterpeny obsahují dvě izoprenové jednotky a tvoří převážnou část všech rostlinných esenciálních olejů. Seskviterpeny se skládají ze tří izoprenových jednotek a svými funkčními vlastnostmi jsou monoterpenům velmi blízké (Bajpai et al., 2012). Spojování izoprenových jednotek probíhá téměř vždy v jednom směru, tzv. spojování hlava – pata. Rozvětvený konec řetězce se označuje jako hlava molekuly a druhý konec jako pata. Tento způsob spojování vysvětluje biosyntézu terpenoidů. Klíčový meziproduct představuje kyselina mevalonová, která vzniká ze tří molekul acetyl-CoA. Fosforylace mevalonové kyseliny s následnou eliminací terciárního alkoholu a současná dekarboxylace přilehlé kyseliny umožňuje vznik isopentenyl pyrofosfátu. Ten pak může být izomerován za vzniku prenyl pyrofosfátu. Spojováním těchto dvou jednotek s pěti atomy uhlíku dojde k vytvoření jednotky s deseti uhlíky, tzv. geranyl pyrofosfátu. Další připojení isopentenyl pyrofosfátu vede ke tvorbě 15-, 20-, 25-, a vyšším uhlíkovým jednotkám (Baser and Buchbauer, 2010).

Aromatické sloučeniny jsou deriváty fenylypropanů, které vznikají šikimátovou cestou. Kyselina šikimová je syntetizována z fosfoenolpyruvátu a erytroza-4-fosfátu. Její biosyntéza tak začíná od sacharidové dráhy. Deriváty kyseliny šikimové obvykle vykazují její strukturu šestičlenného kruhu s příslušnými substituenty. Jedná se o skupiny aldehydů, alkoholů, fenolů i methoxy a methylen dioxy skupiny. Také některé dusíkaté a sírné sloučeniny jsou známy jako složky rostlinných silic (Bajpai et al., 2012).

3.2.5 Hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Mezi čeledi s vysokým obsahem siličnatých látek patří hluchavkovité, kam řadíme byliny s typicky čtyřhrannými lodyhami a vstřícně křížmostojnými listy, které jsou zpravidla jednoduché, často chlupaté a žláznaté. Květy vyrůstají ve zkrácených úžlabních vidlanech a mají dvoupyskou tlamatou korunu a dvoudomé tyčinky. Na bázi semeníku je žláznatý val. Patří sem druhy medonosné, okrasné, plevelné i rumištní. Rostou ve všech kontinentech, nejvíce však v Mediteránu (Novák a Skalický, 2009). Díky vysokému obsahu polyfenolů byly tyto rostliny často zkoumány jako možné zdroje přírodních antioxidantů (Fecka and Turek, 2008).

3.2.5.1 Tymián

Tymián (*Thymus vulgaris* L.) je aromatická a léčivá bylina z čeledi *Lamiaceae* (Badi et al., 2004). Pochází ze západních oblastí Středozevního moře, kde je součástí „macchií“, což jsou stále zelené porosty. Je to polokeř o výšce asi 20–40 cm, většinou je zimovzdorný, avšak v našich podmínkách může i vymrzat. Květy mají nachovou barvu a plodem je tvrdka. Tymián je rostlinou medonosnou. Pěstuje se v několika zahradních formách, např. anglický, širokolistý, nebo francouzský úzkolistý, a to v mnoha zemích Evropy jako je Španělsko, Itálie, Portugalsko, Francie, Anglie, Německo, Maďarsko, Bulharsko, Řecko, ale také jinde ve světě (Valchař, 2013). Vyrůstající význam má pro ekonomiku v Severní Americe a severní Africe (Al-Ramamneh, 2009) a podle Badi et al. (2004) je tymián v současné době pěstován ve velkém měřítku i v Íránu.

Existuje velké množství druhů lišící se nejen vzhledem, ale i svou chutí a vůní (např. tymián citrónový). Obecně je však vůně tymiánu kořeněná, pepřná, teplá, zemitá a ostrá. Chuť aromatická, silně kořeněná, bohatá, lehce nahořklá s náznakem hřebíčku, máty a kafru. Čím vyšší je obsah karvakrolu, tím intenzivnější a silnější je chuť. Právě díky své chuti je tak tymián základní bylinou používanou ve většině kuchyní Evropy a Středního Východu (Valchař, 2013).

Těkavé oleje obsažené v tymiánu patří mezi deset nejkvalitnějších silic a jsou široce využívány v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Některé studie přisuzují tymiánu antiseptické, karminativní, antimikrobiální a antioxidační vlastnosti (Al-Ramamneh, 2009). Fecka a Turek (2008) upřesňují, že bylina a její extrakt jsou užívány orálně k léčbě dispepsie a dalších gastrointestinálních poruch, k léčbě kašle a různých forem bronchitid, laryngitid

a při zánětu mandlí. Dále je tato bylina využívána k ošetření drobných ran, k zvýšení obranyschopnosti při chřipce a v ústní hygieně např. k osvěžení dechu. Podle Valchaře (2013) také zlepšuje funkci pohlavních žláz. V Číně slouží jako povzbuzující a tonizující prostředek, který je vhodný při depresích, migréně a při potížích s krevním oběhem.

Biosyntéza sekundárních metabolitů je silně ovlivněna životním prostředím. Kvantitativní a kvalitativní vlastnosti tymiánu jsou velkou měrou ovlivněny zemědělskými faktory. Velmi důležité je především dodržování rozestupů při sázení a dobré naplánování sklizně (Badi et al., 2004). Ukázalo se, že pěstování tymiánu v 15 cm meziřádcích výrazně zvyšuje výtěžnost porostu a silic na jednotku plochy. Nicméně větší rozestup s meziřádky o velikosti 45 cm způsobují vyšší růst rostlin a výtěžnost porostu a silic na rostlinu (Al-Ramamneh, 2009). Co se týká doby sklizně, nejkvalitnější tymián se získává z rostlin těsně před rozkvetem, přičemž ke sklizni dochází dvakrát do roka (Valchař, 2013). Jiné zdroje však uvádějí, že obsah silic je nejvyšší u kvetoucích rostlin (Al-Ramamneh, 2009).

Nať obsahuje 0,8 až 2,3 % silice, v níž je až z 50 % zastoupen thymol, dále karvakrol, pinen, *p*-cimen, limonen, linalylacetát, geranylacetát, 1,8-cineol (eukalyptol), kafr, karvon, geraniol, citral, linalool, borneol a další. V tymiánové silici může být obsaženo až 50 různých látek. Obsah silice pak závisí na velikosti listů a může být až 6,5 % (francouzský tymián). Hlavními látkami obsaženými v tymiánu obecném jsou 4-terpineol a thymol. Tymián dále obsahuje flavonoidy, fenoly, třísloviny, hořčiny, kyseliny, saponiny aj. (Valchař, 2013).

3.2.5.2 Saturejka

Saturejka je jednoletá či vytrvalá bylina z čeledi *Lamiaceae*. Pochází z jižní Evropy a oblasti Mediteránu (Esquível et al., 1999). Ovísková a Valchař (2012) upřesňují, že bylina má domov především ve východním Středomoří, v oblasti Černého moře a Malé Asie. Planě však roste ve všech zemích jižní Evropy, na Krymu, Kavkazu, Zakavkazsku a zdomácněla v podstatě v celém Středozeří, ve střední Evropě, západní Asii a Indii. Pěstuje se však také v jižní Africe a Severní Americe. Aksu and Özer (2013) uvádějí, že saturejka má tymiánové aroma. Což potvrzují i Ovísková a Valchař (2012), kteří píší, že bylina je blízce příbuzná tymiánu, dobromysli, majoránce či rozmarýnu. Jedná se o hustě větvenou rostlinu, která dorůstá výšky až 50 cm. Listy jsou úzké, eliptické, tmavě zelené a přibližně 0,5 až 1,0 cm dlouhé (Esquível et al., 1999). Na okraji mají listy velice tenké chloupky. Květy jsou růžové až jemně fialové (Ovísková a Valchař, 2012).

Listy, květy a stonky se pro své aroma a chuť používají jako čaje nebo potravinářská aditiva (Aksu and Özer, 2013). Jako aromatické koření je saturejka oblíbená v různých úpravách v podstatě po celém světě. Její chuť je příjemně štiplavá (Ovísková a Valchař, 2012) a tak je často přidávána do pečiva, masných výrobků, zpracované zeleniny, kořenících přípravků, anebo slouží k dochucení polévek či omáček (Novak et al., 2006). Kořenářsky jsou významné dva středomořské druhy saturejky – jednoletá saturejka zahradní (*Satureja hortensis*) a vytrvalá saturejka horská (*Satureja montana*). V praxi se však můžeme setkat i s jinými druhy (Ovísková a Valchař, 2012).

Bylina vykazuje celou řadu biologických aktivit, jako jsou antispazmodická a antinociceptivní aktivita, dále působí proti průjmům a má antioxidační a antimikrobiální vlastnosti (Aksu and Özer, 2013). Pomáhá i při nadýmání, a proto je používána do tučných jídel a nadýmajících pokrmů, zejména při přípravě luštěnin (Ovísková a Valchař, 2012). V tradiční medicíně je často využívána při léčbě křečí nebo při bolestech svalů (Dorman and Hiltunen, 2004). Rovněž působí jako antiseptikum při onemocnění horních cest dýchacích, při poranění hrtanu a krku, pomáhá při kašli a zahlenění (Ovísková a Valchař, 2012).

Silice je popisována jako kapalina světle žluté až tmavě hnědé barvy (Aksu and Özer, 2013). Bylina ji obsahuje méně než 1 % své váhy (Esquivel et al., 1999). Hlavní složkou silice je karvakrol a γ -terpinen (Novak et al., 2006), dále limonen, *p*-cymen a β -karyofylen (Esquivel et al., 1999). Zajímavý je také obsah taninu, který se pohybuje mezi 4 až 8 % (Ovísková a Valchař, 2012).

3.2.6 Mechanismus účinku silic

Bajpai et al. (2012) uvádějí, že se několik předešlých výzkumů zabývalo rostlinnými silicemi s cílem potvrdit jejich biologickou účinnost proti bakteriím a plísním, avšak výsledky nepřinesly žádná důvěryhodná data. Antimikrobiální účinek nemůže být potvrzen jako účinek jedné sloučeniny, protože silice obsahují celou řadu látek. Kromě toho různé silice nebo jejich složky nevykazují antimikrobiální mechanismus účinku pouze na jednom místě, ale působí na různých místech v buňce. Hydrofobní charakter silic zajišťuje jejich dobrou interakci s lipidovou membránou bakteriálních patogenů, což vede ke ztrátě vnitřních buněčných komponent, stejně tak k ovlivnění refluxe draselného iontu, eventuálně to může vést i k buněčné smrti.

Obecně lze říci, že silice, které mají charakter fenolických sloučenin, působí efektivněji proti alimentárním patogenním bakteriím. Záleží také na chemickém složení a těkavosti sloučenin, protože i ty mají velký vliv na antimikrobiální mechanismy esenciálních olejů. Například fenoly, které obsahují OH-skupinu, vykazují lepší účinek proti bakteriálním patogenům. To potvrzuje i Jayasena and Jo (2013), kteří píší, že antimikrobiální aktivita je trvale spojena s fenolickými látkami jako je karvakrol, eugenol a thymol. Dále mohou silice poškodit různé enzymové systémy včetně enzymů, které jsou zapojeny v energetické regulaci a v syntéze strukturních komponent, mohou inaktivovat nebo zničit genetický materiál, a tím pak dochází k posílení jejich antimikrobiálních aktivit. Také terpenové sloučeniny jsou velmi známé z důvodu jejich působení na buněčnou membránu bakterií, čímž pozměňují buněčné funkce (Bajpai et al., 2012).

Bylo prokázáno, že kromě antimikrobiálních vlastností, vykazují silice také antivirové, antimykotické, antioxigenní, antiparazitické a insekticidní účinky. Tyto vlastnosti možná souvisí s funkcemi, které plní v dané rostlině (Burt, 2004). Velmi slibnou oblastí využití silic se zdá být jejich použití proti nádorům. Od roku 1990 stoupá zájem o prozkoumání protirakovinných vlastností těchto rostlinných látek, neboť "přírodní" terapie je akceptována pacienty po celém světě. Jedna z nejvýznamnějších látek v tomto smyslu je d-limonen, což je hlavní komponent esenciálního oleje ze sladkého pomeranče (*Citrus sinensis*). Nadějně se však zdají být i látky izolované z kůry dalších citrusových plodů (Baser and Buchbauer, 2010).

3.2.7 Současné využití silic

Nejvíce jsou silice využívány v potravinářství, v parfumeriích a farmakologii. Velmi známe je jejich využití v aromaterapii, toto odvětví však představuje pouze 2 % celkového trhu. Jednotlivé složky silic jsou také známe jako potravinářská aromata, která je možno extrahovat z rostlin nebo vyrábět synteticky (Burt, 2004). Ty jsou pak používány k aromatizaci cukrářských výrobků, cukrovinek, čokolády, čaje a tabáku (Růžičková, 2002). Antibakteriální vlastnosti silic a jejich složek jsou také využívány v komerčních produktech zubní hygieny, v dezinfekčních prostředcích i v krmných doplňcích pro prasnice v průběhu laktace. V potravinářství jsou již dostupné některé konzervanty, které obsahují silice. Například „DMC Base Natural“ je potravinový konzervant produkovaný firmou DOMCA S. A., Alhendín, Granada, Španělsko, který obsahuje 50 % silice z rozmarýnu, šalvěže, citrusu a 50 % glycerolu. „Protecta One“ a „Protecta Two“ jsou směsi bylinných extraktů vyráběné

firmou Bavaria Corp. Apopka, FL, USA, které jsou obecně uznávané jako bezpečná potravinářská aditiva ve Spojených státech. Ačkoli není znám jejich přesný obsah, extrakty pravděpodobně obsahují jednu nebo více silic a jsou rozptýleny v roztoku citrátu sodného a chloridu sodného. Další fyziologické účinky silic byly využity i při potlačení klíčení brambor nebo jako repelentní prostředky proti hmyzu (Burt, 2004). Velmi oblíbeny a využívány jsou siličnaté drogy v lidovém léčitelství. Mnohé z nich totiž upravují zažívání, zmírňují nadýmání, působí močopudně nebo mají protizánětlivé a uklidňující účinky. Jiné se zase využívají jako koření k dochucení pokrmů (Růžičková, 2002).

3.2.8 Antimikrobiální aktivita silic v potravinách

Až do roku 1990 bylo jen velmi málo výzkumů zaměřeno na využití rostlinných silic jako přírodních konzervantů v potravinářství. Po roce 1990 však některé výzkumy potvrdily možnou účinnost těchto látek jako konzervantů (Bajpai et al., 2012). Avšak jakkoli dobře vycházela účinnost silic v antibakteriálních testech *in vitro*, zjistilo se, že pro dosažení stejného výsledku v potravinách je zapotřebí vyšší koncentrace silic. Tento poměr byl stanoven jako přibližně dvojnásobný v případě částečně odstředěného mléka, desetinásobný u klobásy z vepřových jater, padesátinásobný v polévce a dokonce stonásobný při pokusu s měkkým sýrem. Výjimku tvoří výzkumy s bakterií *Aeromonas hydrophila*, kdy pro inhibici tohoto druhu bakterie ve vařeném vepřovém mase a salátu nebylo nutné použít větší množství silic než bylo využito v testech *in vitro*.

Velký vliv na mikrobiální rezistenci k silicím mají samotné potraviny. Citlivost bakterií může být ovlivněna jak vnitřními, tak i vnějšími vlastnostmi potraviny. Vnímavost bakterií k antimikrobiálním účinkům silic se tak zdá být větší při poklesu pH, skladovací teploty a množství kyslíku v nebalené potravine. Při nižším pH se totiž zvyšuje hydrofobita silic, díky níž lze snadněji rozpustit lipidovou membránu bakterií. Předpokládá se, že větší zastoupení tuků nebo bílkovin v potravine jakýmsi způsobem chrání bakterie před účinkem silic. Příkladem může být pokus, kdy silice rozpuštěná v tukové fázi potraviny působila na bakterie méně než silice ve vodné fázi (Burt, 2004). Naopak sacharidy, ve srovnání s tuky a bílkovinami, mají jen malou schopnost chránit bakterie před účinky silic. (Bajpai et al., 2012). Účinek silice může být podpořen i přítomností soli v potravine (Burt, 2004). Zajímavý pokus uskutečnili Skandamis et al. (2000). Ti zjistili, že typ růstového média ovlivňuje jak růst bakterií, tak i účinnost silic. Silice oregana vykazovala větší inhibiční účinky proti *Salmonella typhimurium* v kapalném médiu ve srovnání se želatinovou maticí.

Přidání silice do želatinové matrice zpozdilo počáteční růst a způsobilo mírné potlačení maximální úrovně populace bakterií, zatímco v kapalném médiu za identických podmínek, byl růst bakterií kompletně potlačen. Z toho vyplývá, že i struktura potraviny má vliv na antibakteriální aktivitu silic (Burt, 2004).

3.2.8.1 Maso a masné výrobky

Jayasena a Jo (2013) uvádějí, že esenciální oleje vykazují antibakteriální a antifugální aktivitu proti několika mikroorganismům, které jsou spojovány s masem. Autoři studií se zaměřují na zkoumání účinků esenciálních olejů z různých zdrojů, jakými jsou oregano, rozmarýn, tymián, šalvěj, bazalka, kurkuma, koriandr, zázvor, česnek, muškátový oříšek, muškátový květ, hřebíček, saturejka a fenykl. Ve svých výzkumech používají esenciální oleje samostatně nebo v kombinaci s jinými silicemi, často i ve spojení s dalšími způsoby konzervace, za účelem zlepšení sensorických vlastností a prodloužení trvanlivosti masa a masných výrobků.

3.2.8.1.1 Metody aplikace silic v masné výrobě

Mnoho studií se zabývá aplikací silic jako antimikrobiálních látek vhodných pro použití v masné výrobě (Jayasena and Jo, 2013). Silice dostupné na trhu pro živočišnou výrobu jsou známé svými příznivými účinky na zažívání. V závislosti na biologických účincích silic je možné uvažovat o jejich aplikaci jako ochranných a terapeutických prostředků. Příjem silic ovlivňuje složení gastrointestinální mikroflóry. Předěšlé výzkumy zaměřené na antibakteriální aktivitu silic potvrdily jejich potenciální účinek na tvorbu oocytů kokciidií a na počet bakterií u kuřat brojlerů, která byla uměle inokulována. Z obchodního hlediska jsou silice často prezentovány jako výživové doplňky. Bylo zjištěno, že karvakrol má vliv na redukci váhy zvířete a jeho celkový nutriční příjem, avšak zlepšení bylo pozorováno u brojlerů, kteří byli krmeni příslušnou stravou po dobu čtyř týdnů. Je tedy možné, že esenciální oleje mohou u zvířat ovlivňovat nejen střevní mikroflóru, ale i využívání živin (Bajpai et al., 2012). Luna et al. (2010) ve své studii hodnotili efekt thymolu a karvakrolu, použitých jako suplementů krmiva, na lipidovou oxidaci u masa brojlerů. Jako pozitivní kontrola byl použit antioxidant butylhydroxytoluen. Brojleři byli zařazeni do jedné ze čtyř variant: kontrola, 150 mg/kg butylhydroxytoluenu (pozitivní kontrola), 150 mg/kg thymolu a 150 mg/kg karvakrolu. Vzorky prsou a stehien byly skladovány při teplotě 4 °C po dobu 0, 5 a 10 dní. Oxidace lipidů

byla stanovena analýzou 2-TBA reaktivních látek (TBARS). Hladiny TBARS se významně zvýšily u vzorků skladovaných 5 a 10 dnů. Autoři zjistili, že suplementované krmivo nemělo žádný vliv na oxidaci lipidů u kuřecích prsou. Nicméně pátý a desátý den skladování byly zaznamenány vyšší hodnoty TBARS u kontrolní skupiny vzorků stehen ve srovnání s dalšími třemi suplementovanými skupinami. Je zajímavé, že u těchto suplementovaných skupin byly zjištěny stejné nízké hodnoty TBARS. Z toho důvodu lze považovat přírodní antioxidanty, thymol a karvakrol, jako užitečné pro zlepšení kvality drůbežího masa.

Začleňování silic do potravinových obalů může být bezpečná alternativa k jiným konzervačním metodám používaných v potravinářství (Bajpai et al., 2012). Robertson (2010) uvádí, že těkavé látky z oregana prodloužily trvanlivost mletého hovězího masa. Silice byla v tomto případě aplikována na filtrační papír a ten byl umístěn do balení tak, aby nebyl v přímém kontaktu s masem. Oral et al. (2009) uvádějí, že za nejméně úspěšný komerční využití antimikrobiálních látek v obalových materiálech lze považovat sáčky či podložky, které obsahují těkavé sloučeniny. V jejich studii byl zkoumán efekt silice z oregana na prodloužení trvanlivosti balených kuřecích paliček. Podložka sloužící k zachycení přebytečné tekutiny se nastříkala 5 ml roztoku silice o koncentraci 1,5 %. Odběr vzorků byl prováděn za chladírenské teploty během několika dnů. Trvanlivost čerstvých kuřecích paliček byla přibližně 3 dny. Silice oregana prodloužila úchovu výrobku zhruba o 2 dny. Začlenění silic do absorpčních podložek tak může být doplňkovou aplikací v balení potravin. Jiný způsob aplikace silic vyzkoušeli Ha et al. (2001), kteří pomocí koextruze začlenili extrakt z grepových semen do vícevrstvé polyethylenové folie. Tuto metodu následně srovnávali s metodou, kdy na polyethylenový film nanесли roztok téhož extraktu ve formě povlaku. Obě metody byly testovány u baleného mletého hovězího masa, se zaměřením na mikrobiologické hodnocení, změny barvy a oxidaci. Větší antimikrobiální aktivitu vykazovala folie ošetřená roztokem ve srovnání s folií vytvořenou koextruzí. Během skladování takto ošetřeného produktu nebyly pozorovány výrazné změny barvy ani nebyla ovlivněna oxidace lipidů.

Silice mohou být přidávány také do tzv. jedlých vrstev. Jedlé vrstvy nebo povlaky jsou definovány jako souvislé matrice, které jsou připraveny z bílkovin, polysacharidů a tuků. Z bílkovin se nejčastěji využívá pšeničný lepek, kolagen, dále pak proteiny z kukuřice, sóji, pšenice i mléka. Naopak polysacharidové povlaky jsou vyráběny z alginátů, pektinu, dextrinu a celulózy. Tuky využívané při výrobě jedlých povlaků zahrnují vosky, acylglyceroly a mastné kyseliny. Do roztoků, ze kterých tyto povlaky vznikají, se často přidávají i různá změkčovadla (např. sorbitol, manitol), která zlepšují finální vlastnosti povlaků. Formování povlaků lze provádět několika technikami zahrnující odstranění rozpouštědla, tvorbu želatiny

nebo pomocí tuhnutí taveniny. Takto připravené jedlé vrstvy slouží jako nosiče širokého množství potravinových aditiv, včetně různých antimikrobiálních látek, které mohou prodloužit trvanlivost výrobku nebo snížit riziko růstu patogenů na povrchu potraviny (Cagri et al., 2004). Fernández-Pan et al. (2014) použili pro svůj výzkum jedlý povlak tvořený syrovátkovou bílkovinou, do kterého začlenili silice z oregana a hřebíčku. Tento nerozpustný, homogenní a kontinuální syrovátkový povlak vytvořil na kuřecím masa jakousi neviditelnou druhou kůži. Tím pádem se nezměnil ani vzhled masa, ačkoli došlo k mírnému zvýšení jasů. Povlaky obsahující silici z oregana prodloužily trvanlivost masa ze šesti na třináct dnů. Tím byla potvrzena účinnost těchto povlaků jako nosičů antimikrobiálních látek.

Přímé začlenění silic do potravin je limitováno řadou technologických problémů, které souvisí s jejich adekvátním rozptýlením v potravine, dále s kontrolou jejich interakce s dalšími složkami, stejně jako s jejich konzervační aktivitou využitou v požadovaný čas. Možným způsobem, jak překonat tyto problémy je enkapsulace silic do vhodných nosičů, které mohou přispět ke zlepšení ochrany bioaktivních sloučenin před chemickou degradací, stejně tak jako mohou zajistit adekvátní rozptýlení silic na potřebné části potraviny, kde se množí mikroorganismy. Taktéž tyto systémy mohou snížit vliv silic na sensorické vlastnosti potraviny i zlepšit jejich biologickou aktivitu (Donsì et al., 2014). Jedním ze způsobů enkapsulace je tvorba emulze. Tato metoda je většinou aplikována pro enkapsulaci bioaktivních látek ve vodném prostředí, které mohou být použity přímo v kapalném stavu nebo je lze vysušit za vzniku prášku. Emulze se skládá nejméně ze dvou nesmíselných kapalin, obvykle z oleje a vody, přičemž se jedna z kapalin rozptýlí do druhé a vytvoří tak malé kuličky (Fang and Bhandari, 2010). Donsì et al. (2014) píší, že použití nanoemulze olej/voda je ideálním nosičem pro silice, protože umožňuje nejenom pomalé a postupné uvolňování antimikrobiálních látek do potraviny, ale přispívá také k jejich začlenění do celého komplexu potraviny.

3.2.8.1.1.1 Jílové nanočástice

Jílové nanočástice jsou relativně nové materiály, které se za různými účely začleňují do obalových materiálů. Kombinace polymerů a jílových nanokompozitů je vhodná alternativa k tradičním polymerům, a to především díky jejich mechanickým, bariérovým a fyzikálním vlastnostem i tepelné stabilitě (Tornuk et al., 2015). Sanchez-Garcia et al. (2010) potvrzují, že již přídavek malého množství jílových nanočástic (méně než 10 % hm.) způsobuje podstatné zvýšení pevnosti, tepelné stability a bariérových vlastností pro plyny

a páru, a to aniž by byly ohroženy vlastnosti jako je odolnost nebo transparentnost. Kromě toho mohou jílové nanočástice pomáhat uvolňovat aktivní materiály po delší dobu, a to tím, že zvyšují jejich rozpustnost v polymeru (tzv. řízené uvolňování). Díky tomu prodlužují trvanlivost takto balených potravin. Nejvíce studovaný typ jílových nanočástic spojovaný s potravinami je hydratovaný hlinito-křemičitanový vrstvený jíl tzv. montmorillonit. Dalším typem je tzv. halloysit, což je též hlinito-křemičitanový jíl, který má tubulární strukturu s vnitřním průměrem od 20 do 50 nm a délku až 10 μm . (Tornuk et al., 2015).

3.2.8.1.2 Synergistický efekt silic

Silice mohou být také využity pouze jako součást překážkového systému, který má za cíl konzervační účinek. Lze kupříkladu kombinovat nižší hladiny silic s již existující či novou metodou konzervace a použít je tak například s nízkou teplotou nebo okyselením, s modifikovanou atmosférou, s vysokým hydrostatickým tlakem, s dalšími konzervačními látkami (nisin, dusitan) nebo v kombinaci s ozářením (Jayasena and Jo, 2013).

Skandamis and Nychas (2002) zkoumali kombinaci účinků silice z oregana a modifikované atmosféry na sensorické, mikrobiologické a fyzikálně-chemické vlastnosti čerstvého masa, které bylo skladováno při 5 a 15 °C. Kus papíru Whatman č. 6 byl ponořen do silice po dobu deseti vteřin a poté byl umístěn do obalu tak, aby se zabránilo jeho kontaktu s masem. Delší doba trvanlivosti masa byla pozorována u vzorků s přídavkem silic, které byly zároveň skladovány v podmínkách modifikované atmosféry. Sensorické hodnocení takto ošetřených vzorků ukázalo, že zkoumaná antimikrobiální látka nemá žádný vliv na chuť masa. Stejnou kombinaci konzervačních metod použili i Chouliara et al. (2007), kteří využili účinku silice oregana a modifikované atmosféry při prodloužení úchovy kuřecího masa. Jejich výsledky, které byly založené především na sensorických datech, ukázaly, že trvanlivost aerobně baleného masa byla 5 dnů. Přidání 0,1 % silice z oregana způsobilo prodloužení trvanlivost produktu o 3–4 dny, zatímco skladování v modifikované atmosféře prodloužilo úchovu pouze o 2–3 dny. Avšak kombinací obou metod, tedy silice a modifikované atmosféry, byla trvanlivost prodloužena o 5–6 dní. Kanatt et al. (2008) zase zjišťovali možnost prodloužení trvanlivosti masa pomocí extraktu z máty a chitosanu. Mátový extrakt má potřebné antioxidační vlastnosti, zatímco chitosan vykazuje velmi dobrou antimikrobiální aktivitu. Studie dokázala, že kombinace těchto látek je vhodným konzervačním prostředkem pro maso a masné výrobky. Zajímavou studii provedli i Mastromatteo et al. (2009), kteří studovali kombinovaný účinek silic thymolu a karvakrolu

společně s teplotou na mikrobiologickou kvalitu drůbežích karbanátků skladovaných za běžných podmínek i v modifikované atmosféře. Výsledky ukázaly, že celkový počet živých buněk klesá s nárůstem přidávaného karvakrolu. Účinek thymolu byl ve srovnání s karvakrolem výrazně méně patrný. Synergický účinek na počty živých buněk měla kombinace modifikované atmosféry a thymolu. Karatzas et al. (2000) hodnotili kombinaci účinku S-carvonu a mírného tepelného ošetření na *Listeria monocytogenes*. Životaschopnost bakterií v exponenciální fázi růstu při 8 °C byla výrazně snížena po expozici S-carvonem po dobu 30 minut při teplotě 45 °C. Samostatné ošetření S-carvonem nebo vystavení teplotě 45 °C po dobu 30 minut nezpůsobilo ztrátu životaschopnosti. Tato skutečnost ukazuje, že silice hrají důležitou roli v konzervaci minimálně zpracovaných potravin a mohou být využity při konceptu tzv. překážkové technologie, např. ke snižování intenzity tepelného ošetření.

O synergickém efektu mluvíme i v případě, když využijeme kombinačního efektu sloučenin silic, který má často větší účinek, než kdybychom použili látky samostatně. Průzkumy navíc ukazují, že silice jako celek vykazuje lepší antibakteriální účinnost, než různé kombinace jejich majoritních komponent (Bajpai et al., 2012). Je tedy možné říci, že minoritní složky silic hrají stěžejní roli při zvyšování biologické účinnosti silic (Burt, 2004)

3.2.9 Omezení a limity využití silic

Aplikace silic v potravinářství má i svoje rizika a omezení. Některé silice mohou například interagovat s určitými složkami potravin i jejich strukturou, což může mít vliv na jejich účinnost. Účinnost silic v potravinách tak může být značně ovlivněna přítomností lipidů, sacharidů, proteinů nebo i solí. Tím lze vysvětlit i sníženou aktivitu silic aplikovaných na mase a masných výrobcích ve srovnání s výsledky z pokusů *in vitro* (Jayasena and Jo, 2013).

Čím více rozšířené bude využívání silic jako antimikrobiálních látek v potravinách, tím důležitější bude i jejich vliv na organoleptické vlastnosti (Burt, 2004). Z toho důvodu je použití silic jako konzervantů omezeno především na pikantní jídla, včetně masa, neboť tyto potraviny jsou nejčastěji spojovány s bylinkami a kořením. Řešením tohoto problému může být využití silic v kombinaci s dalšími metodami konzervace, což umožní použít nižší koncentrace těchto látek. Několik autorů tvrdí, že vhodné je začlenění silic do jedlých vrstev a povlaků, enkapsulace do polymerů či použití nanoemulze. (Jayasena and Jo, 2013).

Navzdory tomu, že značná část silic byla schválena k aromatizaci potravin, některé studie poukazují a naznačují na jejich dráždivost a toxicitu. Například látky jako eugenol, menthol a thymol jsou známy tím, že způsobují podráždění dásní v případě, když dojde k zasažení kořenových kanálků (Burt, 2004). Stamatou et al. (1999) zjistili, že cinnamaldehyd, karvakrol, karvon a thymol vykazují při testech *in vitro* mírné cytotoxické účinky, které však pro spotřebitele nejsou nebezpečné, neboť těmto látkám není vystaven v takové míře, aby pro něj představovaly zvýšené riziko. Přesto se doporučuje, aby bylo provedeno více studií zabývajících se vlivem silic na lidský organismus. Tyto studie by se měly týkat především látek, které jsou v potravinářství využívány ve větší míře nebo jsou používány jejich vyšší koncentrace (Burt, 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Silice

Pro účely experimentu byly použity rostlinné silice získané z Výzkumné stanice Uhřetěves. Konkrétně byly v experimentu aplikovány tymiánová silice a silice ze saturejky, které byly z rostlinného materiálu vyextrahovány pomocí destilační metody. Silice byly dále enkapsulovány do jílových nanočástic – Nanoclay, hydrophilic bentonite (Sigma-Aldrich, USA).

4.2 Kmeny bakterií

V experimentu byly použity bakteriální inokula připravená z kmenů bakterií *Escherichia coli* ATCC 25922 (Thermo Scientific, USA) a *Salmonella enterica* sv Enteritidis ATCC 13076 (Thermo Scientific, USA). Při přípravě bakteriálního inokula byl použit Mueller-Hinton bujón (Oxoid, CZ). Pro kultivaci bakterií pak byly využity tato kultivační média: pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byl připraven Plate count agar (Oxoid, CZ), v případě analýzy vzorků ošetřených *E. coli*, byl jako kultivační médium zvolen MacConkey agar (Oxoid, CZ) a u vzorků zaočkovaných *Salmonellou enteritidis* pak XLD agar (Sigma-Aldrich, USA). Během experimentu byl využit také sterilní fyziologický roztok. Pro přípravu 1litru fyziologického roztoku bylo použito 8,5 g NaCl, 1 g peptonu (Roth, Německo) a 1 g polysorbátu – Tween 80 (Roth, Německo).

4.3 Kuřecí maso

Kuřecí prsní řízky byly zakoupeny v místním řeznictví a do doby experimentu skladovány v lednici při 4 °C.

4.4 Příprava vzorků

4.4.1 Enkapsulace silic do jílových nanočástic

Jílové nanočástice (nanojíl) byly umístěny do skleněné kádinky a během 4 hodin vysušeny při 160 °C. Takto vysušený materiál byl do doby enkapsulace ponechán v exsikátoru.

Enkapsulace silic byla provedena s již vysušeným nanojílem, který byl navážen do skleněných vialek. Do stejných vialek byly napipetovány silice, a to ve dvou rozdílných koncentracích (silice:nanojíl - 1:5, 1:10 w/w). Tento postup byl proveden ve třech opakováních. Takto připravené vialky byly připevněny na třepačku a umístěny do termostatu vyhřátého na 50 °C, kde se třepaly 24 hodin (viz. Příloha 1).

4.4.2 Příprava bakteriálního inokula

Bakteriální inokulum o počtu bakterií 10^8 KTJ/ml bylo připraveno z den starých bakteriálních kultur inkubovaných při 37 °C. Jeho příprava spočívala v naředění a homogenizaci bakteriálních kolonií v Mueller-Hintonově bujónu na denzitu, která odpovídala McFarlandovu standardu 0,5. Denzita bakteriální suspenze byla měřena na denzitometru (DEN-1B, Biosan).

4.4.3 Příprava a ošetření kuřecího masa

Příprava i ošetření kuřecího masa byly uskutečněny ve sterilním prostředí laminárního boxu (SCS-III, Merci, CZ). Jelikož je kuřecí maso vhodným substrátem pro mikroorganismy, bylo nutné odstranit z jeho povrchu veškeré patogeny. K tomu byl využit 70% ethanol, do kterého byla jednotlivá kuřecí prsa na 30 sekund namáčena. Po tomto ošetření byly z masa odstraněny veškeré části, které přišly do kontaktu s lihem. Takto upravené maso bylo nakrájeno na přibližně 5g kousky, které byly do doby ošetření skladovány při -18 °C.

Před ošetřením byly kuřecí kousky rozmrazeny. Každý kousek masa (5 g) byl zaočkován 50 μ l bakteriálního inokula a nechal se oschnout. Poté byly jednotlivé kousky masa ošetřeny podle požadovaných variant (T, S, KZ, KJ, KV) a koncentrací (1:5, 1:10), dle Tabulky 1. Vzorky T a S byly připraveny obalením kousku masa v 250 mg nanojílu s enkapsulovanou silicí tymiánu nebo saturejky (viz. Příloha 2). V experimentu byly použity tři kontroly, a sice kontrola nárůstu (KZ), tedy zaočkované maso bez dalšího ošetření, dále byl použit pouze čistý neošetřený jíl (KJ), kterým bylo maso ošetřeno ve stejném množství jako v případě variant se silicí, tzn. 250 mg a jako třetí kontrola (KV) byla použita sterilní destilovaná voda (50 ml), ve které byly zaočkované kousky masa omyty. Všechny varianty vzorků byly připraveny ve třech opakováních. Takto ošetřené kousky masa byly skladovány v plastových Petriho miskách při chladírenské teplotě 4 °C a vyhodnocovány 1., 7. a 14. den skladování.

Tabulka 1 Varianty ošetření vzorků

Vzorek	Silice	Koncentrace silice	Způsob ošetření	Inokulum bakterie
T	tymián	1:5	nanojíl	<i>Escherichia coli</i>
		1:10		
	tymián	1:5	nanojíl	<i>Salmonella enteritidis</i>
		1:10		
S	saturejka	1:5	nanojíl	<i>Escherichia coli</i>
		1:10		
	saturejka	1:5	nanojíl	<i>Salmonella enteritidis</i>
		1:10		
KZ	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>
		-		
	-	-	-	<i>Salmonella enteritidis</i>
		-		
KV	-	-	oplach vodou	<i>Escherichia coli</i>
		-		
	-	-	oplach vodou	<i>Salmonella enteritidis</i>
		-		
KJ	-	-	nanojíl	<i>Escherichia coli</i>
		-		
	-	-	nanojíl	<i>Salmonella enteritidis</i>
		-		

Pozn.: **T** - vzorek ošetřený tymiánovou silicí; **S** - vzorek ošetřený saturejkovou silicí; **KZ** - kontrola zaočkování; **KV** - kontrola voda; **KJ** - kontrola jíl

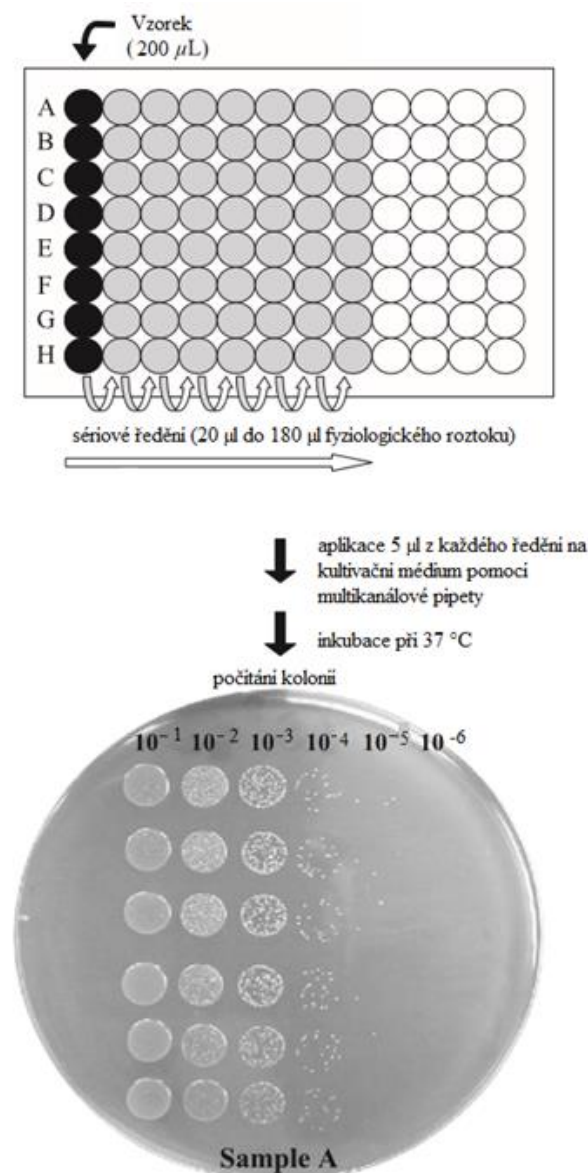
4.5 Metody analýzy

4.5.1 Mikrobiologická analýza

Vzorky masa byly v příslušných dnech vyhodnocovány pomocí mikrobiologické analýzy za použití tzv. kapkové metody dle Chen et al. (2003). Mikrobiologická analýza byla uskutečněna ve sterilním prostředí laminárního boxu (SCS-III, Merci, CZ) a za použití běžného laboratorního nářadí, které bylo řádně sterilováno. Každý vzorek byl zvážen a následně umístěn do sterilní Erlenmeyerovy baňky, do níž byl přidán fyziologický roztok v množství, které se rovnalo desetinásobku váhy vzorku. Takto připravené vzorky byly umístěny na třepačku, kde se třepaly po dobu 5 minut. Z každého vytřepaného vzorku byla

slita tekutina, která byla v množství 200 μl napipetována do první jamky u všech řádků na mikrodiluční destičce, dle Obrázku 1. Do ostatních jamek bylo postupně napipetováno 180 μl fyziologického roztoku. Pomocí multikanálové pipety bylo odebráno 20 μl ze vzorkové tekutiny, ta byla přendána do následujícího sloupce s fyziologickým roztokem, kde došlo k důkladnému promíchání. Tento proces byl zopakován, čímž postupně došlo k vytvoření ředící řady. Důležitá je při tom výměna špiček mezi každým ředěním.

Následně bylo z každého ředění napipetováno 5 μl roztoku, který byl pomocí multikanálové pipety nanesen na Petriho misky s neselektivním i selektivním kultivačním médiem, a to ve dvou opakováních. Takto připravené Petriho misky byly umístěny do termostatu, kde byly inkubovány při 37 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 h.



Obrázek 1 Schéma Kapkové metody podle Chen et al. (2003).

Vyhodnocení počtu bakterií po kultivaci spočívalo ve spočtení narostlých kolonií na jednotlivých Petriho miskách. Počet bakterií vyjádřený pomocí KTJ/g byl stanoven pomocí vzorce:

$$N = C/v (n_1 + 0,1 n_2) d$$

kde: C je celkový počet kolonií na všech spočítaných miskách (kapkách)

v je objem jedné kapky

n_1 je počet kapek v prvním ředění

n_2 je počet kapek ve druhém ředění

d je ředění, ze kterého vzešel první počet kapek

4.5.2 Senzorická analýza

Cílem sensorické analýzy bylo stanovení vlivu silic na organoleptické vlastnosti masa a na celkovou přijatelnost pro konzumenty. K sensorické analýze hodnocení kuřecího masa bylo přizváno 10 proškolených hodnotitelů. Hodnocení vzorků probíhalo v sensorické laboratoři. Vybraní hodnotitelé byli seznámeni pouze se základními informacemi týkající se samotného hodnocení. Své hodnocení zaznamenávali do předem připravených formulářů (viz. Příloha 5). Formuláře byly vytvořeny s použitím nestrukturované grafické stupnice s hodnocením intenzity.

Příprava vzorků pro sensorickou analýzu byla provedena tak, aby byla co nejvíce podobná přípravě vzorků během experimentu. To znamená, že v místním řeznictví byly zakoupeny kuřecí prsní řízky, které byly nakrájeny na přibližně 5g kousky. Ty byly dále upraveny podle požadovaného ošetření.

Celkem bylo připraveno šest variant ošetření masa:

- oplach ve vodě (provádí se těsně před tepelným zpracováním)
- obalení ve vysušeném nanojílu bez silice
- obalení v nanojílu s enkapsulovanou silicí tymiánu o koncentraci 1:5
- obalení v nanojílu s enkapsulovanou silicí saturejky o koncentraci 1:5
- obalení v nanojílu s enkapsulovanou silicí tymiánu o koncentraci 1:10
- obalení v nanojílu s enkapsulovanou silicí saturejky o koncentraci 1:10

Takto ošetřené kousky masa byly uzavřeny do Petriho misek a skladovány v lednici při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin. Druhý den byly všechny vzorky, které byly obaleny v nanojílů, důkladně opláchnuty a přendány do uzavíratelných skleniček. Vzorky masa bez ošetření nanojílem byly taktéž omyty pod proudem vody a umístěny do skleniček. Víčka skleniček byla zakódována čtyřmístným kódem, který by měl hodnotiteli znemožnit orientaci mezi vzorky. Uzavřené skleničky se vzorky byly následně umístěny na 30 minut do přehřáté laboratorní sušárny, která byla vyhřáta na 180 °C. Poté byly vzorky přemístěny do termostatu, kde byly skladovány při teplotě 60 °C do začátku senzoričkého hodnocení.

Před samotnou senzoričskou analýzou byly hodnotitelům rozdány formuláře. Pro neutralizaci chuti mezi jednotlivými vzorky bylo hodnotitelům nabídnuto bílé pečivo a sklenka vody. Vzorky byly hodnotitelům předkládány v pořadí od nejméně ošetřeného vzorku až po vzorek s předpokládaným nejvyšším chuťovým vjemem, tedy s nejvyšší koncentrací silice.

4.6 Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení byl použit program Statistica 12 (StatSoft CR s.r.o.). Výsledky byly hodnoceny podle analýzy rozptylu za použití jednofaktorového testu ANOVA a pomocí Tukeyho HSD testu. Mezi jednotlivými parametry byla zjišťována také korelační závislost. Hladina významnosti byla zvolena $\alpha=0,05$. Statistické vyhodnocení bylo použito k analýze mikrobiologických parametrů i výsledků senzoričkého hodnocení.

5 Výsledky

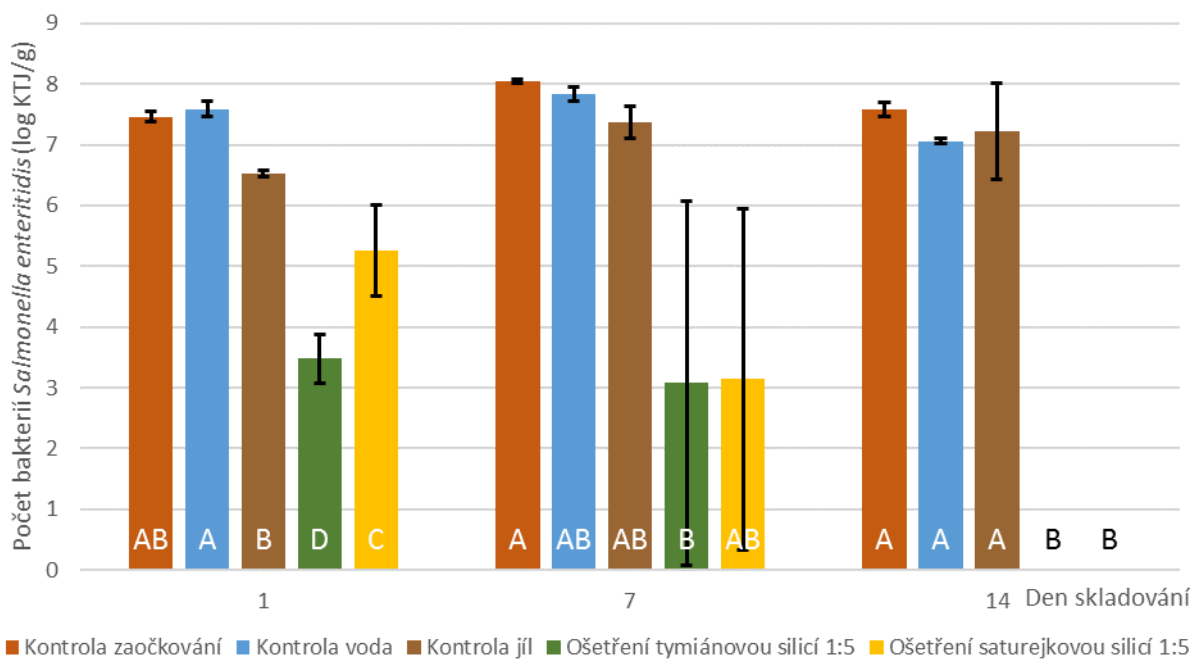
5.1 Vyhodnocení mikrobiologické analýzy

Mikrobiologická analýza byla uskutečněna s cílem prokázat antimikrobiální aktivitu enkapsulovaných silic proti patogenním mikroorganismům přítomným na kuřecím mase. Stanovován byl také jejich vliv na celkový počet mikroorganismů. Vzorke byly hodnoceny podle počtu vzniklých kolonií bakterií *Escherichia coli* a *Salmonella enteritidis* na selektivních kultivačních médiích. V případě stanovení celkového počtu mikroorganismů byl použit neselektivní agar. Stanovení počtu patogenních mikroorganismů i celkového počtu mikroorganismů bylo zjišťováno v průběhu skladování, a to 1., 7. a 14. den.

5.1.1 Bakterie *Salmonella enteritidis*

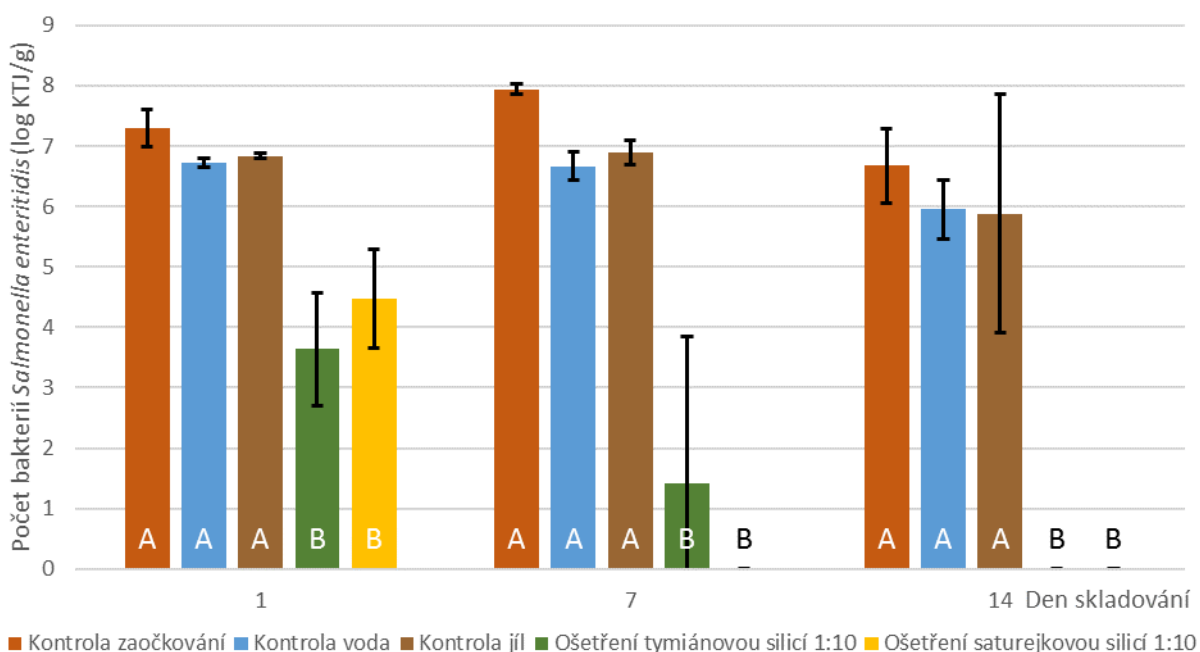
Z grafů 1 a 2 je zřejmé, že obě použité silice vykazovaly znatelnou antimikrobiální aktivitu proti patogenní bakterii *Salmonella enteritidis*, neboť počty bakterií, u vzorků ošetřených silicemi, během skladování postupně klesaly. Naproti tomu všechny tři kontroly se od sebe v jednotlivých dnech příliš nelišily.

Větší účinek proti bakterii vykazovala tymiánová silice (např. viz. Příloha 3), jejíž účinnost byla patrná již od prvního dne skladování, kdy se počet bakterií lišil od kontroly zaočkování o téměř $4 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Statisticky významný rozdíl je patrný nejen mezi kontrolami a vzorky ošetřenými silicemi, ale v případě vyšší koncentrace i mezi silicemi navzájem. V 7. dnu došlo k ještě výraznějšímu prohloubení rozdílů mezi vzorky ošetřenými tymiánovou silicí a všemi kontrolami, rozdíl v počtu bakterií byl ve srovnání s kontrolou zaočkování $5 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, v případě koncentrace 1:5 a o více jak $6 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ u nižší koncentrace silice. V posledním dnu skladování došlo vlivem ošetření silicemi k úplné eliminaci patogenních bakterií u obou koncentrací.



Graf 1 Počty bakterií *Salmonella enteritidis*, koncentrace silice 1:5.

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).



Graf 2 Počty bakterií *Salmonella enteritidis*, koncentrace silice 1:10.

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

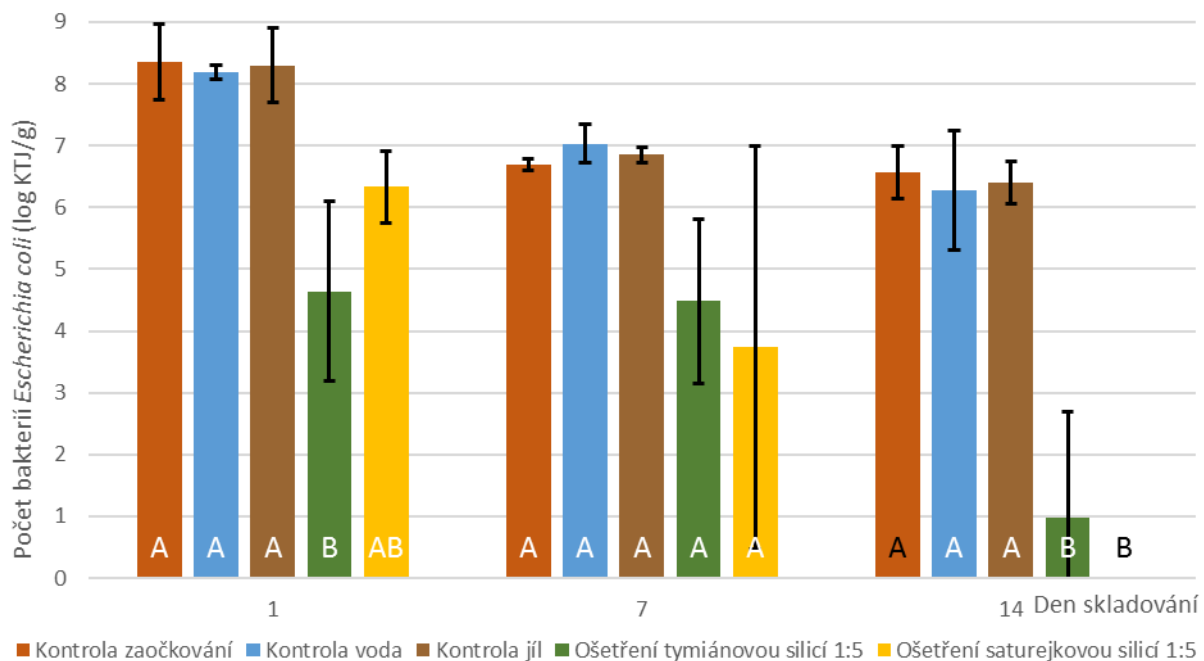
5.1.2 Bakterie *Escherichia coli*

Obě silice značně inhibovaly růst patogenní bakterie *Escherichia coli*, jak je patrné z grafů 3 a 4. Počet bakterií u vzorků, které byly ošetřeny silicemi, postupně klesal, a to u obou použitých koncentrací. Patrný je však i mírný pokles počtu bakterií u kontrol během skladování.

Výraznější inhibiční účinek byl zaznamenán u tymiánové silice (např. viz. Příloha 4), avšak ve srovnání s účinkem proti bakterii *Salmonella enteritidis* (Graf 2), jsou rozdíly v počtu bakterií mezi ošetřenými vzorky a kontrolou menší.

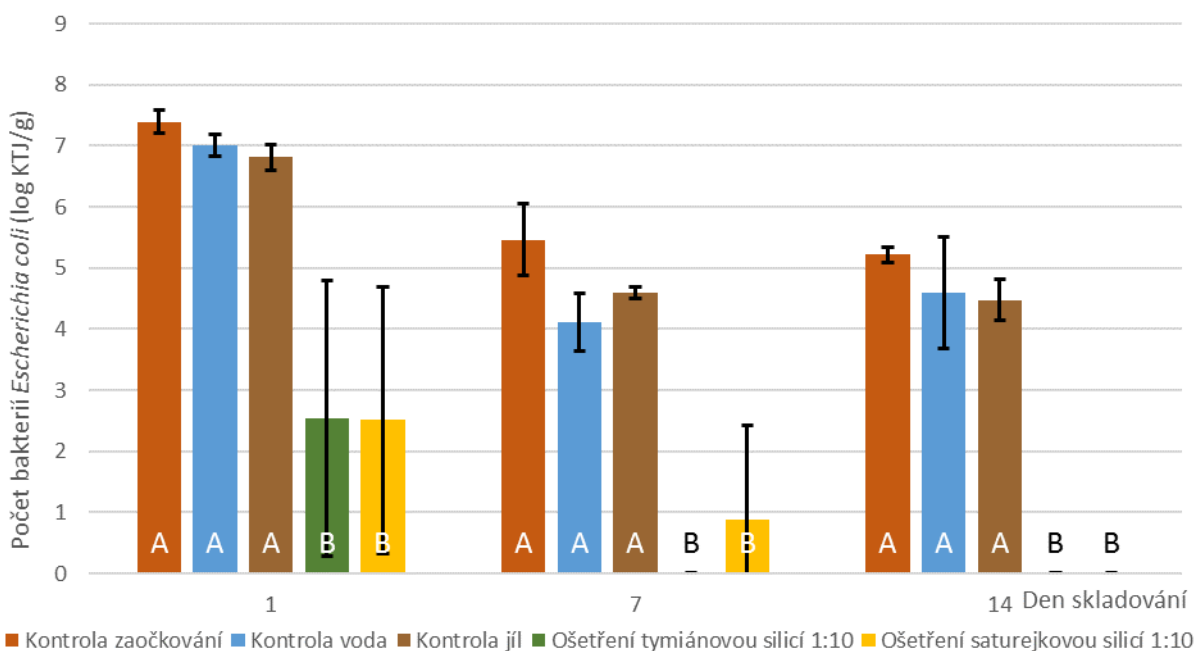
V 1. dnu je rozdíl v počtu bakterií *Escherichia coli*, u vzorků ošetřených tymiánovou silicí 1:5, oproti kontrole zaočkování $3,5 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ (Graf 3), avšak 7. den se zdá být účinnější silice saturejky, jejíž ošetření se v počtu bakterií liší od kontroly zaočkování o necelé $3 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Přestože je v 7. dnu tento rozdíl patrný, mezi ošetřenými vzorky a kontrolními vzorky neexistuje statisticky významný rozdíl.

U nižší koncentrace 1:10 (Graf 4) je účinek silic v 1. den skladování srovnatelný, rozdíl v počtu bakterií je ve srovnání s kontrolou zaočkování téměř $5 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. V další dny dochází k postupné eliminaci bakterií vlivem silic, avšak snižuje se i počet bakterií u kontrolních vzorků. Pořád je však patrná statistická významnost mezi ošetřenými vzorky a vzorky kontrol.



Graf 3 Počty bakterií *Escherichia coli*, koncentrace silice 1:5.

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

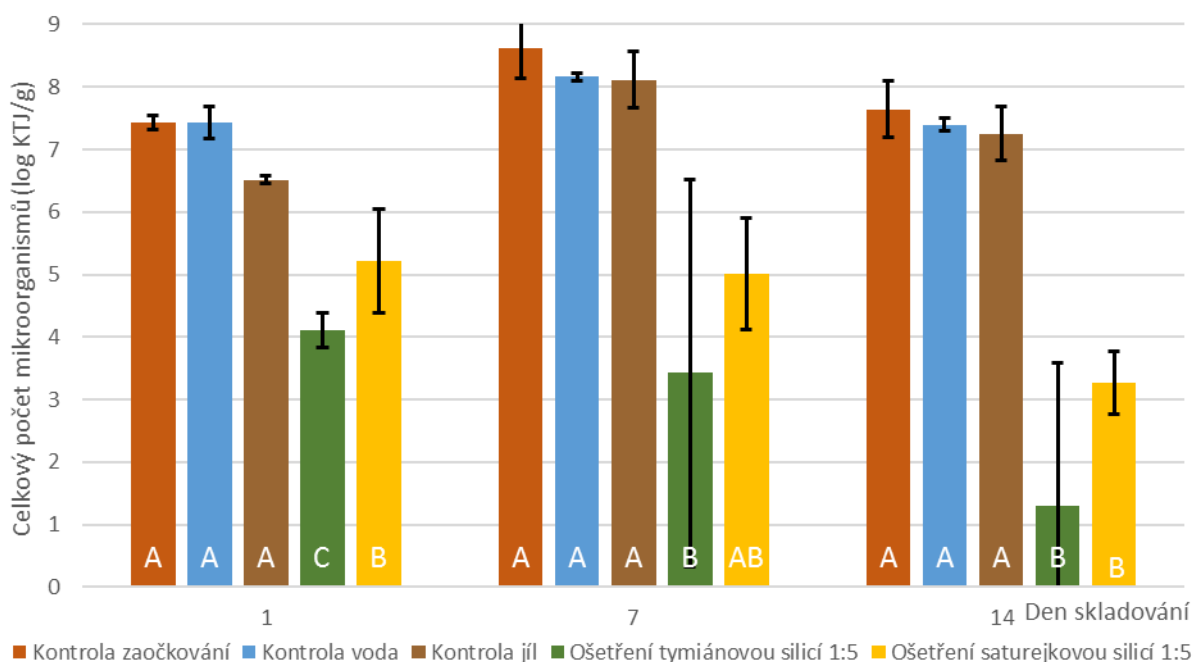


Graf 4 Počty bakterií *Escherichia coli*, koncentrace silice 1:10.

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

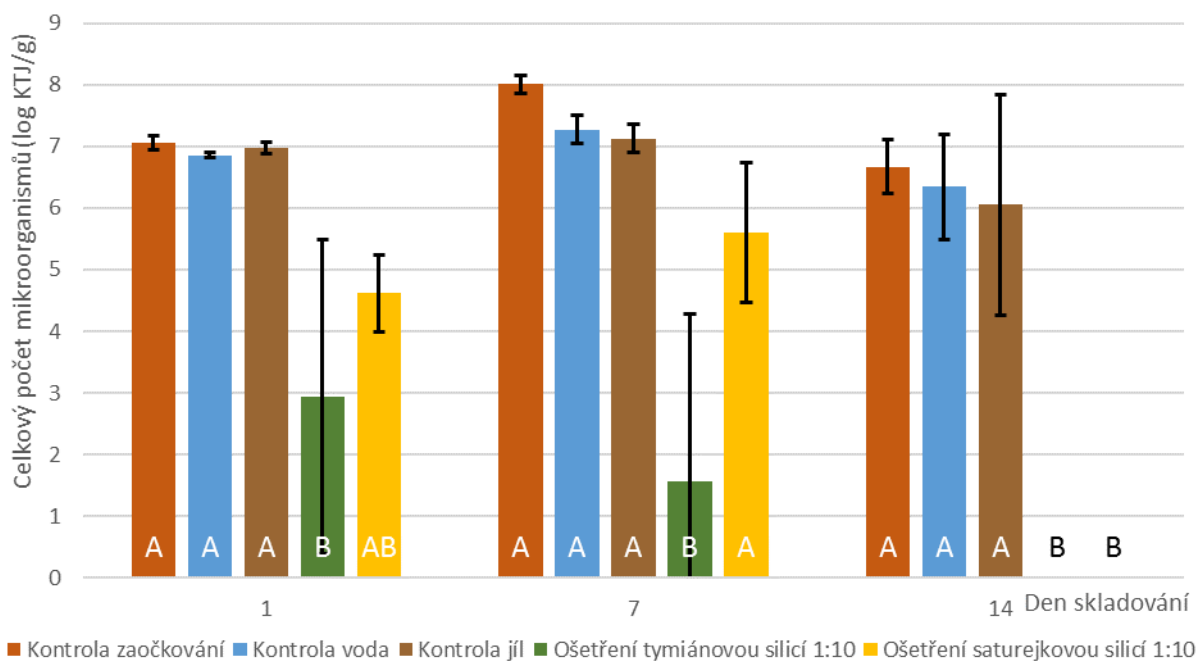
5.1.3 Celkové počty mikroorganismů

Silice dokázaly snížit také celkový počet mikroorganismů. V případě vzorků, které byly vyhodnocovány paralelně se vzorky zaočkovanými bakterií *Salmonella enteritidis* (Grafy 5 a 6), je patrné, že počty bakterií u vzorků ošetřených silicemi klesaly, přičemž větší inhibiční efekt vykazovala tymiánová silice. U kontrol došlo k mírnému nárůstu počtu bakterií v 7. dnu skladování, poté se však počty bakterií opět snížily. Vždy však na hodnotu, která tyto kontrolní vzorky statisticky významně odlišovala od silicemi ošetřených vzorků.



Graf 5 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaného bakterií *Salmonella enteritidis*, koncentrace silice 1:5.

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).



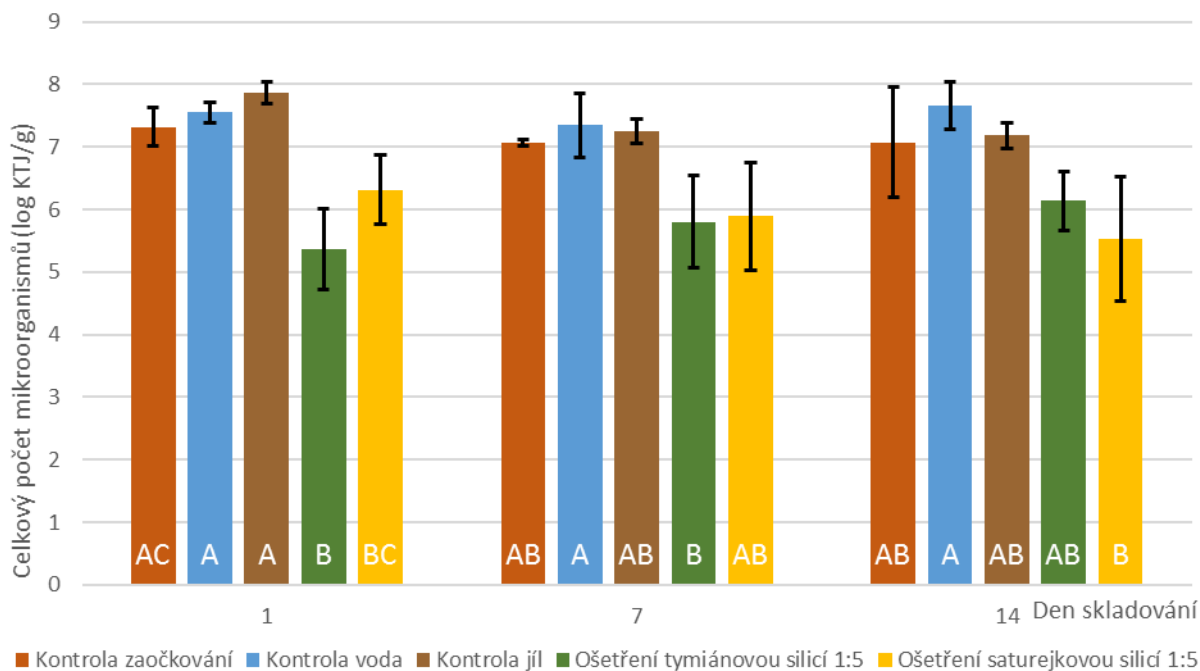
Graf 6 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkováného bakterií *Salmonella enteritidis*, koncentrace silice 1:10.

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

U vzorků, které byly zaočkovány bakterií *Escherichia coli*, byla účinnost silic proti celkovému počtu mikroorganismů podstatně slabší (Graf 7 a 8) ve srovnání se vzorky zaočkoványými *Salmonellou enteritidis*. To je patrné u vzorků ošetřených vyšší koncentrací silic.

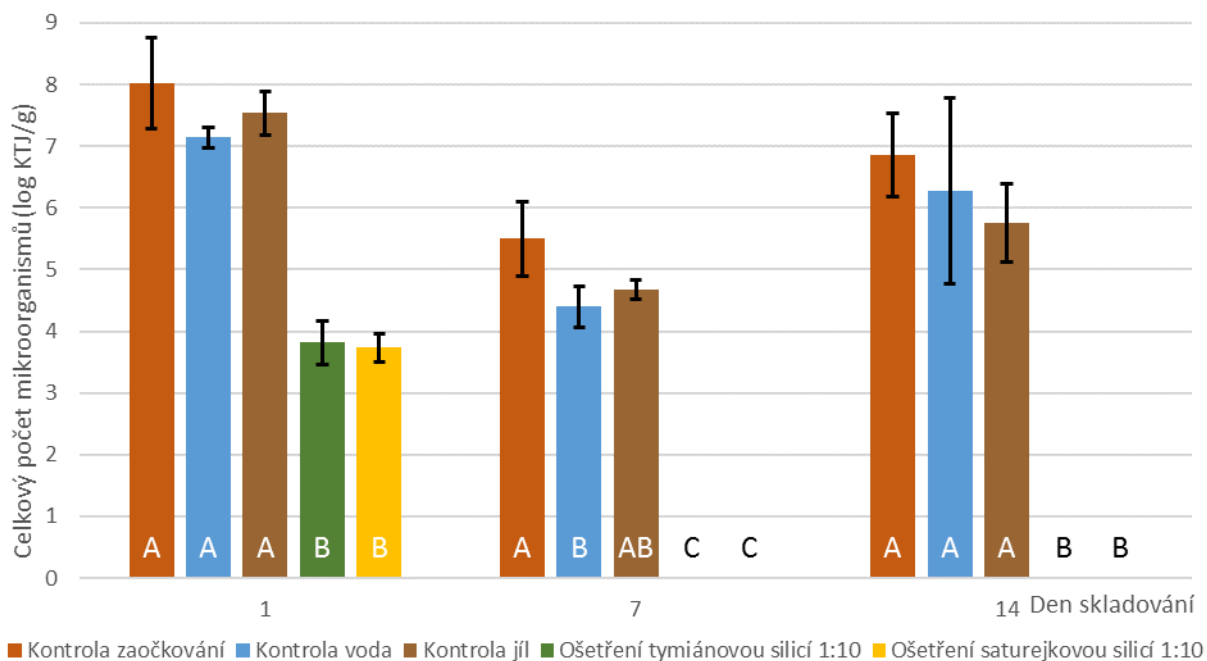
Největší rozdíl v počtu mikroorganismů je v 1. dnu, kdy se liší vzorky ošetřené tymiánovou silicí od kontroly zaočkování o 2 log KTJ.g⁻¹. Navíc se počty mikroorganismů u ošetřených vzorků během skladování příliš nemění.

U koncentrace 1:10 (Graf 8) je patrný znatelný inhibiční efekt vzorků ošetřených silicemi proti celkovému počtu mikroorganismů. Již v 7. dnu došlo vlivem účinku silic k úplnému potlačení mikroorganismů, avšak zároveň se snížil počet mikroorganismů i u vzorků kontrol. Poslední den skladování však počty mikroorganismů u vzorků kontrol opět narostly, avšak ošetřené vzorky zůstaly beze změny.



Graf 7 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaného bakterií *Escherichia coli*, koncentrace silice 1:5.

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

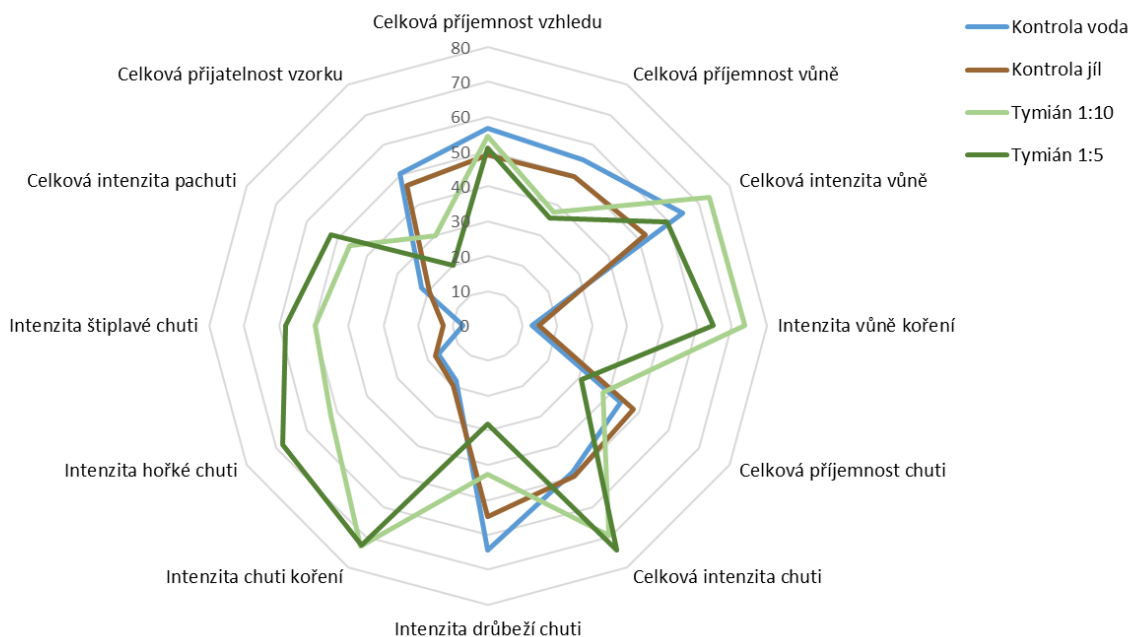


Graf 8 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaných bakterií *Escherichia coli*, koncentrace silice 1:10.

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

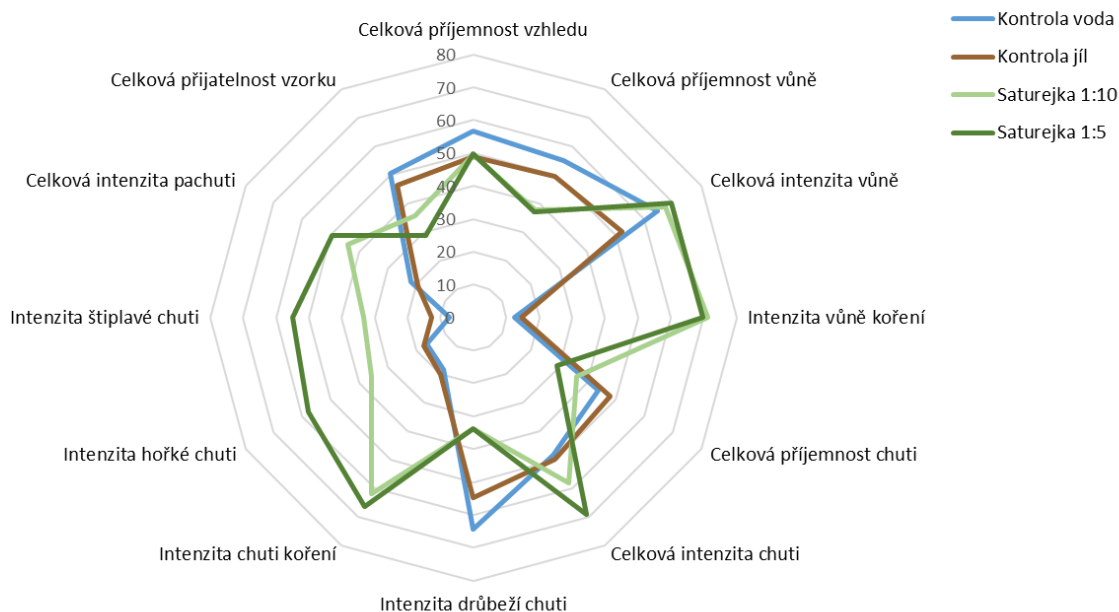
5.2 Vyhodnocení sensorické analýzy

Senzorická analýza byla provedena s cílem zjistit, jakým způsobem jsou ovlivněny organoleptické vlastnosti kuřecího masa po ošetření silicemi, které byly enkapsulovány do jílových nanočástic. Důležité bylo vyhodnocení celkové přijatelnosti ošetřených vzorků pro konzumenta ve srovnání s kontrolami.



Graf 9 Hodnocení deskriptorů sensorické analýzy u vzorků ošetřených tymiánovou silicí [%].

Z paprskového grafu, který byl použit pro vzájemné porovnání deskriptorů u vzorků ošetřených tymiánovou silicí a u vzorků kontrol (Graf 9), je patrné, že pro hodnotitele byly více přijatelné vzorky kontrol ve srovnání se vzorky, které byly ošetřeny tymiánovou silicí. Vzorky ošetřené tymiánovou silicí se navíc lišily v celkové přijatelnosti podle použitých koncentrací tak, že koncentrovanější ošetření (1:5) bylo pro hodnotitele méně přijatelné než varianty ošetřené nižší koncentrací silice (1:10). Stejný vývoj přijatelnosti vzorku byl zaznamenán při porovnání deskriptorů u vzorků ošetřených silicí ze saturejky vůči připraveným kontrolám (Graf 10). Z obou grafů je jasně čitelné, že celková přijatelnost vzorku byla ovlivněna celkovou příjemností chuti, vůně a vzhledu, neboť i v těchto parametrech hodnotitelé dali přednost kontrolním vzorkům (také viz. Příloha 6).



Graf 10 Hodnocení deskriptorů sensorické analýzy u vzorků ošetřených silicí ze saturejky [%].

Grafy dokazují, že přidavek silic potlačuje u vzorků typickou drůbeží chuť, která je přebíjena intenzivní chutí koření. Výsledky jasně ukazují, že chuť koření byla u obou silic tak výrazná, že namísto příjemné kořeněné chuti, hodnotitelé cítili na jazyku hořkou, štiplavou chuť, která zanechávala v ústech hodnotitelů určitou pachutí. Zaznamenané pachutě se mezi jednotlivými koncentracemi ošetření příliš nelišily, nejvíce byly zmiňovány termíny jako hořká a svíravá pachutí nebo silná pachutí koření. Někteří hodnotitelé byli konkrétnější a ve formuláři uvedli, že cítili pachutě připomínající mátu, tymián, oregano, ale i například hřebíček či nové koření.

Přidavek silic měl i celkem očekávaný vliv na vnímání vůně, neboť hodnotitelé zaznamenali u takto ošetřených vzorků vůni koření. Tato vůně byla však hodnotiteli vnímána spíše negativně a pravděpodobně tak byla příliš intenzivní. Avšak u deskriptoru pro celkovou intenzitu vůně nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky (Tabulka 2).

Statistické vyhodnocení výsledků sensorické analýzy bylo pro obě silice uskutečněno na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Z Tabulky 2, která popisuje statistické rozdíly u vzorků ošetřených tymiánovou silicí, je zřejmé, že v z hlediska přijatelnosti vzorku byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi koncentrací silice 1:5 a oběma kontrolami, a naopak nižší koncentrace silice se nelišila od žádného dalšího vzorku. V případě celkové intenzity chuti byl stanoven statisticky významný rozdíl mezi koncentrovanějším ošetřením (1:5) a oběma

kontrolami, nižší koncentrace tymiánové silice (1:10) se od ostatních vzorků nelišila. Stejně výsledky byly zaznamenány u intenzity drůbeží chuti, kdy je patrný statisticky významný rozdíl mezi koncentrací silice 1:5 a oběma kontrolami, avšak koncentrace silice 1:10 se v tomto deskriptoru neliší od dalších vzorků. Jestliže porovnáme obě koncentrace tymiánové silice z hlediska jejich hořké a štiplavé chuti, zjistíme, že mezi nimi neexistuje statisticky významný rozdíl. Stejný statisticky nevýznamný rozdíl mezi koncentrací silice 1:5 a 1:10 je patrný i u celkové příjemnosti vůně, kde navíc neexistuje staticky významný rozdíl ani mezi vzorky ošetřenými silicí a oběma kontrolami.

Tabulka 2 Statistické zhodnocení deskriptorů u vzorků ošetřených tymiánovou silicí [%].

Hodnocené deskriptory	Kontrola voda		Kontrola jíl		Tymián 1:10		Tymián 1:5	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Celková příjemnost vzhledu	56,6	± 14,4 ^a	49,0	± 15,8 ^a	54,3	± 10,7 ^a	51,1	± 17,2 ^a
Celková příjemnost vůně	54,9	± 18,4 ^a	49,6	± 21,7 ^a	37,7	± 18,8 ^a	35,7	± 19,8 ^a
Celková intenzita vůně	64,6	± 11,0 ^a	52,1	± 20,8 ^a	73,5	± 10,4 ^a	59,4	± 20,2 ^a
Intenzita vůně koření	12,6	± 15,5 ^a	14,6	± 15,8 ^a	73,8	± 17,1 ^b	64,7	± 15,7 ^b
Celková příjemnost chuti	44,0	± 20,4 ^a	48,1	± 22,3 ^a	38,0	± 19,3 ^a	31,0	± 24,1 ^a
Celková intenzita chuti	48,5	± 14,5 ^a	49,7	± 21,2 ^a	69,5	± 13,5 ^{ab}	74,2	± 18,3 ^b
Intenzita drůbeží chuti	64,3	± 18,3 ^a	54,9	± 19,3 ^a	42,6	± 22,4 ^{ab}	28,1	± 21,0 ^b
Intenzita chuti koření	18,2	± 13,6 ^a	19,9	± 12,5 ^a	73,1	± 14,9 ^b	72,6	± 24,0 ^b
Intenzita hořké chuti	16,3	± 15,8 ^a	17,4	± 26,3 ^a	52,1	± 25,6 ^b	68,1	± 23,7 ^b
Intenzita štiplavé chuti	7,2	± 08,3 ^a	12,7	± 14,0 ^a	49,5	± 27,6 ^b	58,1	± 26,6 ^b
Celková intenzita pachuti	21,9	± 25,3 ^a	19,5	± 26,5 ^a	45,8	± 33,3 ^a	52,1	± 26,0 ^a
Celková přijatelnost vzorku	50,4	± 19,5 ^a	46,4	± 25,7 ^a	30,0	± 17,0 ^{ab}	20,2	± 15,2 ^b

Pozn.: \bar{x} - aritmetický průměr; σ - směrodatná odchylka; a,b - stejná písmena v řádku znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami ($p > 0,05$)

U vzorků ošetřených silicí ze saturejky (Tabulka 3), nebyl v případě celkové přijatelnosti vzorku prokázán statisticky významný rozdíl mezi vzorky. U intenzity hořké a štiplavé chuti byl patrný statisticky významný rozdíl mezi koncentrací silice 1:5 a oběma kontrolami, naopak nižší koncentrace silice 1:10 se nelišila od žádného dalšího vzorku. V případě intenzity drůbeží chuti byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi kontrolou vody a oběma koncentracemi saturejkové silice, ale kontrola jílu se nelišila od žádného dalšího vzorku.

Tabulka 3 Statistické zhodnocení deskriptorů u vzorků ošetřených silicí ze satirejky [%].

Hodnocené deskriptory	Kontrola voda		Kontrola jíl		Satirejka 1:10		Satirejka 1:5	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Celková příjemnost vzhledu	56,6	± 14,4 ^a	49,0	± 15,8 ^a	49,4	± 15,0 ^a	49,8	± 14,5 ^a
Celková příjemnost vůně	54,9	± 18,4 ^a	49,6	± 21,7 ^a	37,7	± 18,4 ^a	36,9	± 26,9 ^a
Celková intenzita vůně	64,6	± 11,0 ^a	52,1	± 20,8 ^a	67,4	± 15,1 ^a	69,4	± 16,3 ^a
Intenzita vůně koření	12,6	± 15,5 ^a	14,6	± 15,8 ^a	71,2	± 10,0 ^b	69,7	± 17,4 ^b
Celková příjemnost chuti	44,0	± 20,4 ^a	48,1	± 22,3 ^a	36,1	± 16,7 ^a	29,4	± 22,7 ^a
Celková intenzita chuti	48,5	± 14,5 ^a	49,7	± 21,2 ^a	57,9	± 13,8 ^a	69,0	± 16,0 ^a
Intenzita drůbeží chuti	64,3	± 18,3 ^b	54,9	± 19,3 ^{ab}	33,9	± 17,9 ^a	33,7	± 21,3 ^a
Intenzita chuti koření	18,2	± 13,6 ^a	19,9	± 12,5 ^a	62,0	± 18,4 ^b	66,3	± 22,7 ^b
Intenzita hořké chuti	16,3	± 15,8 ^a	17,4	± 26,3 ^a	35,8	± 25,9 ^{ab}	57,7	± 31,7 ^b
Intenzita štiplavé chuti	7,2	± 08,3 ^a	12,7	± 14,0 ^a	33,4	± 28,8 ^{ab}	54,9	± 32,0 ^b
Celková intenzita pachutí	21,9	± 25,3 ^a	19,5	± 26,5 ^a	44,2	± 22,9 ^a	49,6	± 30,0 ^a
Celková přijatelnost vzorku	50,4	± 19,5 ^a	46,4	± 25,7 ^a	35,8	± 17,9 ^a	28,7	± 19,9 ^a

Pozn.: \bar{x} - aritmetický průměr; σ - směrodatná odchylka; a,b - stejná písmena v řádku znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami ($p > 0,05$)

Pomocí korelační analýzy (Příloha 6) byly porovnávány jednotlivé deskriptory mezi sebou a bylo zjišťováno, jakým způsobem se navzájem ovlivňují. Z výsledků je patrné, že celková přijatelnost vzorku byla silně ovlivněna jak celkovou příjemností chutě ($r = 0,820$), tak i celkovou příjemností vůně ($r = 0,722$). Dále bylo zjištěno, že na celkovou přijatelnost vzorku má vliv i intenzita pachutě, která však přijatelnost vzorku značně snižuje ($r = -0,638$), neboť při zvyšující se intenzitě pachutí klesá u vzorků intenzita drůbeží chuti ($r = -0,696$). Opačná korelace byla zaznamenána u intenzity štiplavé chuti ($r = 0,736$) a u intenzity hořké chuti ($r = 0,735$), jelikož intenzita těchto deskriptorů se zvyšovala spolu s rostoucí intenzitou pachutí. Celková intenzita chuti pak byla z velké části ovlivněna intenzitou chuti koření, a to tak, že intenzivnější chuť zaznamenali hodnotitelé při zvyšující se intenzitě chuti koření ($r = 0,623$), se kterou se zvyšovala i intenzita vůně koření ($r = 0,834$).

6 Diskuze

Kuřecí maso je velmi populární potravina. Jeho spotřeba se během posledních let výrazně zvýšila. Oblíbenost tohoto masa se dá vysvětlit hned několika důvody. Ty hlavní z nich jsou jeho poměrně nízké výrobní náklady, nízký obsah tuku a vysoká nutriční hodnota (Chouliara et al., 2007). K udržení kvality a zdravotní nezávadnosti kuřecího masa je nezbytné jeho skladování v chladu. Avšak ani to není zárukou jeho dlouhé trvanlivosti (Fernández-Pan et al., 2014). V poslední době je tak, v souvislosti s úchovou potravin, věnována zvýšená pozornost extraktům z bylin a koření (Mastromatteo et al., 2009).

V této práci bylo prokázáno, že celkový počet mikroorganismů i patogenních bakterií může být v čerstvém kuřecím mase snížen pomocí silic enkapsulovaných do jílových nanočástic. Pro experimenty v této studii byly využity dvě rostlinné silice, a sice tymiánová silice a silice ze saturejky.

Výběr silic byl uskutečněn na základě předešlých studií jiných autorů, kterým se podařilo prokázat určitou antimikrobiální aktivitu těchto silic. Příkladem může být studie provedená Carraminana et al. (2008), kterým se podařilo dokázat antimikrobiální aktivitu silic extrahovaných ze saturejky a tymiánu proti *Listeria monocytogenes* v uměle naočkovaném vepřovém mletém masu. Další studie hodnotila efekt saturejkové silice na hovězí maso. Autorskému týmu Aksu a Özer (2013) se pomocí této silice podařil snížit počet bakterií *Enterobacteriaceae* na mletém masu. Ovšem největší rozdíl v počtu bakterií oproti kontrole byl zaznamenán 0,6 log KTJ.g⁻¹. V naší práci byly tyto rozdíly podstatně větší, dosahovaly hodnot přes 3,5 log KTJ.g⁻¹ při použití stejného druhu silice. Tymianová silice se ukázala být účinná také v případě pokusu, který provedli Fratianni et al. (2010), neboť inhibovala mikroflóru způsobující kažení kuřecího masa.

Pro naši práci bylo však důležité zohlednit i případný dopad silic na organoleptické vlastnosti masa. Při výběru silic byl tak důležitý i fakt, že se tymián a saturejka běžně využívají k dochucení pokrmů z masa (Valchař, 2013; Ovisková a Valchař, 2012). Avšak jiní autoři používají ve svých výzkumech i různé další rostlinné extrakty. Chouliara et al. (2007) kupříkladu využili silici z oregana k testování antimikrobiální aktivity na kuřecích prsních řízcích. Méně obvyklou silici využili Lemay et al. (2002), kteří při svých pokusech na drůbežím masu použili extrakt z hořčice nebo He et al. (2014), kteří prokazovali aktivitu silice z hřebíčku na mikrobiální kvalitu masa.

Studie některých autorů jsou zaměřené na zkoumání antimikrobiálního účinku pouze majoritních sloučenin silic. Mastromatteo et al. (2009) tímto způsobem zkoumali silici

oregana, a ve svých pokusech použili pouze její dva hlavní komponenty, thymol a karvakrol, kterým je přisuzován hlavní antimikrobiální účinek. To je v rozporu s názorem Bajpai et al. (2012), kteří tvrdí, že použití silice jako celku, tedy se všemi jejími složkami, je účinnější v boji proti patogenům.

Použité rostlinné extrakty v naší práci jsou si svým složením blízké, neboť obě silice obsahují sloučeniny thymol a karvakrol, které mají podobnou strukturu. (El Adab and Hassouna, 2016). Svoji podobnost ukázaly také v antimikrobiální aktivitě. Přesto se tymiánová silice ukázala být dominantnější jak v boji proti patogenům *Salmonella enteritidis* a *Escherichia coli*, tak i v inhibici celkového počtu mikroorganismů. Celkové počty mikroorganismů však byly stanovovány na zaočkovaných vzorcích, proto se lze domnívat, že většinu takto stanovených mikroorganismů tvořily právě zaočkované patogeny. Výsledky jasně dokázaly, že obě silice mají, ve srovnání s kontrolami, silnou antimikrobiální účinnost proti oběma bakteriím.

Fратиanni et al. (2010) testovali antimikrobiální účinky tymiánu na čerstvém kuřecím masu skladovaném při 4 °C a zjistili, že tymiánová silice je efektivnější v inhibici bakterie *Escherichia coli* ve srovnání se *Salmonellou*. V naší práci není tento efekt patrný, spíše bychom mohli říct, že byl pozorován opačný účinek. Tato neshoda však může být způsobena rozdílným složením použitých silic a jejich aplikací.

Zajímavostí je, že u saturejkové silice se zdá být účinnější její nižší koncentrace. Podobný výsledek ve své studii zaznamenali Aksu a Özer (2013), kteří zkoumali efekt lyofilizovaného vodného extraktu saturejky na kvalitu hovězího masa. Při mikrobiologických testech zjistili, že pro inhibici bakterií *Enterobacteriaceae* je účinnější nižší koncentrace tohoto extraktu.

Volba vhodné koncentrace silic však může činit problémy, neboť množství, které je účinné a inhibuje patogenní mikroorganismy, může být zároveň sensoricky nepřijatelné. V naší práci byly použity dvě rozdílné koncentrace silic, a sice nižší koncentrace (silice:nanojíl - 1:10 w/w) a vyšší koncentrace (silice:nanojíl - 1:5 w/w). Jelikož v našem případě došlo k výrazné inhibici patogenních bakterií i u nižší koncentrace, lze se domnívat, že použitou koncentraci by bylo možné ještě snížit. Což by mohlo mít kladný efekt i na organoleptické vlastnosti ošetřené potraviny, neboť právě sensorické vnímání chuti bylo v naší práci hodnoceno negativně. A to i v případě ošetření nižší koncentrací. Chuť byla hodnocena jako příliš intenzivní a hodnotitelé vnímali nepříjemné pachutě či hořkou a svíravou chuť. Podobnou zkušenost uvádí i Chouliara et al. (2007), kteří ve své práci píší, že silice z oregana v množství 1 % w/w propůjčila vzorkům masa velmi silnou chuť. Stejnou

nežádoucí změnu chuti popisují ve své práci Ntzimani et al. (2011), kteří uvádějí, že aplikace silice oregana (0,2 % v/w) na kuřecí maso značně ovlivnila chuť, a to tak, že maso bylo nahořklé. Na rozdíl od výsledků prezentovaných Giatrakou et al. (2010), kteří zjistili, že přídavek tymiánové silice (0,2 % v/w) do kuřecího masa nebyl hodnotitelům nepříjemný, a naopak měl vliv na příjemnou, kořeněnou chuť masa. Podobnou pozitivní zkušenost popsali i El Adab a Hassouna (2016), kteří ve své studii dokázali, že přídavek 0,25 % v/v tymiánové silice do kuřecích párků neměl žádný negativní efekt na organoleptické vlastnosti výrobku. Tento účinek však může souviset s charakterem produktu, od kterého můžou konzumenti vyžadovat jiné chuťové vlastnosti než je tomu v případě čerstvého masa. Espina et al. (2014) se ve své práci zaměřili na hedonické hodnocení potravin ošetřených silicemi. Jejich výsledky ukázaly, že přijatelnost drůbežích karbanátků pro konzumenty se měnila nejen podle druhu použité silice, ale právě i podle nastavené koncentrace. Tolerance v jejich studii byla stanovena na 20 µl/l pro přídavek karvakrolu i tymiánové silice, 100 µl/l pro mátovou silici a p-cymen. Přidání rozmarýnové silice považovali hodnotitelé za chuťově přijatelné až do hodnoty 200 µl/l. Z těchto výsledků je patrné, že přidání karvakrolu, p-cymenu a tymiánové silice do produktu, může být pro konzumenty méně přijatelné ve srovnání s ostatními silicemi.

Naše studie se zabývala metodou enkapsulace silic do jílových nanočástic. Tento nosič byl vybrán ze dvou důvodů. Jedním z nich je jeho snadná aplikace na maso, neboť se jedná o prášek, ve kterém lze maso snadno obalit. Druhým, a možná podstatnějším důvodem, byla jeho schopnost uvolňovat těkavé látky silic postupně během skladování. To se ukázalo jako účinné, neboť vzorky ošetřené tímto způsobem vykazovaly inhibiční aktivitu proti oběma bakteriím po celou dobu skladování. V případě vzorků naočkovaných *Salmonella enteritidis* došlo ve 14. dnu k úplné eliminaci patogenních bakterií vlivem enkapsulovaných silic, a to u obou koncentrací. Navíc se neprokázalo, že by nanojíl jakýmkoliv způsobem ovlivňoval organoleptické vlastnosti vzorků. Mezi vzorky ošetřeny vodou a vzorky obalenými v čistém nanojílu totiž neexistují žádné statistické rozdíly, což dokazuje, že je hodnotitelé vnímali stejně. Co se týká zdravotní stránky, nanojíl je vlastně upravený hydrofilní bentonit. Bentonit je podle DG SANCO (2016) schváleným potravinářským aditivem označovaným E 558, které patří do skupiny protispékavých látek. Avšak vytvoření nanočástic vyžaduje určitou modifikaci jílového materiálu (Dlouhý a kol., 2011), který by podle některých autorů mohl mít neblahé účinky na lidské zdraví. Tyto nepříznivé účinky by mohly mít spojitost s jejich zvláštními vlastnostmi, včetně velikosti a složení částic, tvaru, elektrostatického náboje, které souvisejí s jejich reaktivitou v biologických systémech

(Verma et al., 2012). EFSA (2015) informovala, že jílové nanočástice používané při výrobě nanokompozitních materiálů nejsou pro konzumenty nebezpečné. Právě využití jílových nanočástic jako nosičů antimikrobiálních látek je dnes velmi časté řešení. Například Tornuk et al. (2015) použili jílové nanočástice s enkapsulovanou silicí tymiánu jako součást tzv. aktivního balení, kdy nanojíl se silicí zakomponovali do plastové fólie, kterou byl produkt obalen. Zjistili, že tento druh obalu vykazuje bakteriostatické účinky proti *Escherichia coli* O157:H7 během skladování hovězího masa. Přímá aplikace jílových nanočástic na potravinu, tak jak je to popsáno v této práci, však dosud nebyla publikována.

Jílové nanočástice s enkapsulovanými silicemi tymiánu a saturejky se ukázaly jako účinný prostředek pro prodloužení trvanlivosti kuřecího masa. Jílové nanočástice tak potvrdily svoje předpoklady vhodných nosičů antimikrobiálních látek. Avšak vzhledem k vzniklým obavám z možného ohrožení zdraví konzumenta, by bylo vhodné provést více studií, které by jasně potvrdily nebo vyvrátily jejich případnou toxicitu. Poté by nic nebránilo jejich masivnímu použití v potravinářství, kde už nyní plní roli významných komponentů obalových materiálů, které pomáhají prodloužit trvanlivost různých potravin a tím chrání konzumenty před nepříjemnými a často i nebezpečnými nákazami z potravin.

Využití silic v potravinářství je však limitováno také jejich ovlivněním sensorických vlastností produktu. Proto se hledají nejrůznější formy aplikace silic, které by umožnily efektivněji využít méně koncentrovanější rostlinné extrakty. I v tomto případě se zdá být nadějně použití jílových nanokompozitů v plastových polymerech, které nabízí postupné uvolňování aktivních sloučenin.

Ovšem najdou se i řešení, kdy silice nemusejí být hlavním konzervačním prvkem. To v případě tzv. překážkových konzervačních technik, které v sobě kombinují několik metod ošetření, jejichž výsledkem je zcela bezpečná potravina. V tomto případě není nutné používat zbytečně vysoké koncentrace látek, čímž se předchází nechtěnému ovlivnění chuti produktu.

7 Závěr

V této práci byl zkoumán účinek silic ze saturejky a tymiánu enkapsulovaných do jílových nanočástic jako možná metoda konzervace čerstvého kuřecího masa. Bylo dokázáno, že takto enkapsulované silice vykazují silnou antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *Salmonella enteritidis* a *Escherichia coli*, které jsou častými patogeny kuřecího masa.

Počty bakterií byly ve srovnání s kontrolami sníženy až o více než 3,5 log KTJ.g⁻¹. Přičemž větší inhibiční aktivitu vykazovala tymiánová silice. Inhibiční účinek silic byl prokázán jak u koncentrace silic 1:5, tak i u nižší koncentrace 1:10, a to po dobu 14 dní při chladírenském skladování.

Jílové nanočástice se tak zdají být vhodným nosičem antimikrobiálních látek, který pomáhá silice uvolňovat postupně, čímž prodlužuje dobu jejich účinku. Navíc jílové nanočástice samy o sobě žádným způsobem neovlivnily chuťové vlastnosti masa.

K ovlivnění sensorických vlastností však došlo vlivem použitých koncentrací silic, které masu propůjčovaly hořkou a štiplavou chuť, která silně přebíjela chuť drůbežího masa.

Do budoucna by bylo vhodné vyzkoušet nižší koncentrace silic, než byly použity v této práci. Je totiž pravděpodobné, že snížená koncentrace by stále vykazovala antimikrobiální aktivitu, avšak neprojevila by se negativně na sensorických vlastnostech potraviny. Také je potřeba rozluštit otázku případné toxicity jílových nanočástic, která rozhodne o jejich dalším využití v potravinářství.

8 Seznam literatury

Aksu, M. I., Özer, H. 2013. Effects of lyophilized water extract of *Satureja hortensis* on the shelf life and quality properties of ground beef. *Journal of Food Processing and Preservation*. 37 (5). 777-783.

Al-Ramamneh, E. A.-D. M. 2009. Plant growth strategies of *Thymus vulgaris* L. in response to population density. *Industrial Crops and Products*. 30 (3). 389-394.

Alexandrakis, D., Brunton, N. P., Downey, G., Scannell, A. G. M. 2012. Identification of spoilage marker metabolites in Irish chicken breast muscle using HPLC, GC-MS coupled with SPME and traditional chemical techniques. *Food Bioprocess technol.* (2012). 1917-1923.

Aymerich, T., Picouet, P. A., Monfort, J. M. 2008. Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*. 78 (1-2). 114-129.

Badi, H. N., Yazdani, D., Ali, M. S., Nazari, F. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*. 19 (3). 231-236.

Bajpai, V. K., Baek, K-H., Kang, S-Ch. 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*. 45 (2). 722-734.

Bardoň, J. 2008. Bakteriální alimentární infekce. *Potravinářská revue*. (2). 11-14.

Baser, K. H. C., Buchbauer, G. 2010. Handbook of essential oils – science, technology, and applications. CRC Press. p. 975. ISBN: 978-1-4200-6315-8.

Borch, E., Kant-Muermans, ML., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 33 (1). 103-120.

Brown, M. H. 1982. Meat microbiology. Applied Science Publishers LTD. London. p. 529. ISBN: 0-85334-138-9.

- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. 2012. Characterization and comparison of spoilage processes in fresh pork and poultry. *Journal of Food Quality*. 35 (5). 372-382.
- Budig, J. 2009. Obal prodává, chrání a informuje. *Maso*. 20 (4). 6-12.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94 (3). 223-253.
- Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E. T. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*. 67 (4). p. 833-848.
- Carraminana, J. J., Rota, C., Burillo, J., Herrera, A. 2008. Antibacterial efficiency of Spanish *Satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. *Journal of Food Protection*. 71 (3). 502-508.
- Chen, C.-Y., Nace, G. W., Irwin, P. L. 2003. A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*. 55 (2). 475-479.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, N. I., Kontominas, M. G. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology*. 24 (6). 607-617.
- DG SANCO. 2016. Food Additives. [online]. [cit. 2016-04-01]. Dostupné z https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/
- Dlouhý, J., Duchek, P., Špírková, M. 2011. Interkalace polárních materiálů do struktury montmorillonitu. *Česká společnost pro výzkum a využití jílu*. 45. 1-5.
- Donsì, F., Cuomo, A., Marchese, E., Ferrari, G. 2014. Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 22 (2014). p. 212-220.

Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. 2004. Fe (III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chemistry*. 88 (2). 193-199.

Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, E. GJ. 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International of Food Microbiology*. 157 (2). 130-141.

Dubská, M., Šatrán, P., Semerád, Z., Slámová, Z. 2013. Salmonela v chovech drůbeže a v drůbežím mase. *Řeznické noviny*. 3 (4). 27-28.

EFSA. 2010. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*. 8(1):1496.

EFSA. 2015. Safety assessment of the substance montmorillonite clay modified by dimethyldialkyl (C16-C18) ammonium chloride for use in food contact materials. *EFSA Journal*. 13 (11):4285.

El Adab, S., Hassouna, M. 2016. Proteolysis, lipolysis and sensory characteristics of Tunisian dry fermented poultry meat sausage with oregano and thyme essential oils. *Journal of Food Safety*. 36 (1). 19-32.

Espina, L., García-Gonzalo, D., Pagán, R. 2014. Impact of essential oils on the taste acceptance of tomato juice, vegetable soup, or poultry burgers. *Journal of Food Science*. 79 (8). 1575-1583.

Esquivel, M. M., Ribeiro, M. A., Bernardo-Gil, M. G. 1999. Supercritical extraction of savory oil: study of antioxidant activity and extract characterization. *Journal of Supercritical Fluids*. 14 (2). 129-138.

Fang, Z., Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science and Technology*. 21 (10). p. 510-523.

- Fecka, I., Turek, S. 2008. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from *Lamiaceae*: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*. 108 (3). 1039-1053.
- Fernández-Pan, I., Carrión-Granda, X., Maté, J. I. 2014. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*. 36 (1). p. 69-75.
- Fратиани, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., Nazzaro, F. 2010. Preservation of chicken breast meat treated thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*. 75 (8). 528-535.
- Gitrakou, V., Ntzimani, A., Savvaidis, I. N. 2010. Effect of chitosan and thyme oil on ready to cook chicken product. *Food Microbiology*. 27 (1). 132-136.
- Ha, J.-U., Kim, Y.-M., Lee, D.-S. 2001. Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. *Packaging Technology and Science*. 15 (2). p. 55-62.
- Hammerum, A. M., Heuer, O. E. 2009. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*. 48 (7). 916-921.
- He, S.K., Yang, Q. M., Ren, X. Y., Zi, J. H., Lu, S. S., Wang, S. Q., Zhang, Y. B., Wang, Y. F. 2014. Antimicrobial efficiency of chitosan solutions and coatings incorporated with clove oil and/or ethylenediaminetetraacetate. *Journal of Food Safety*. 34 (4). 345-352.
- Hui, H. Y., Nip, W.-K., Rogers, R. W., Young, O. A. 2001. *Meat science and applications*. Marcel Dekker. p. 710. ISBN: 0-8247-0548-3.
- Jayasena, D. D., Jo, Ch. 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 34 (2). 96-108.
- Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M. (eds.). 2009. *Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*. Key Publishing s. r. o. Ostrava – Přívoz. 536 s. ISBN: 978-80-7418051-4.

- Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M. (eds.). 2012. Technologie potravin – Přehled tradičních potravinářských výrob. Key Publishing s. r. o. Ostrava – Přívoz. 569 s. ISBN: 978-80-7418-145-0.
- Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M. (eds.). 2013. Technologie potravin – Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích. Key Publishing s. r. o. Ostrava – Přívoz. 496 s. ISBN: 978-80-7418-163-4.
- Kameník, J. 2013. Maso na talíři. Mikrobiologie kažení masa. Maso. 24 (2). 12-17.
- Kameník, J. 2011. Mikrobiologie kažení masa: příčiny a souvislosti. Veterinářství. 61 (8). 453-457.
- Kameník, J., Chomát, P. 2013. „B“ jako balení masa a masných výrobků. Maso. 24 (1). 8-14.
- Kanatt, R. S., Chander, R., Sharma, A. 2008. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. Food Chemistry. 107 (2). 845-852.
- Karatzas, A. K., Bennik, M. H. J., Smid, E. J., Kets, E. P. W. 2000. Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Applied Microbiology. 89 (2). p. 269-301.
- Kerth, Ch. R. 2013. The Science of meat quality. Wiley-Blackwell. p. 283. ISBN: 13: 978-0-8138-1543-5/2013.
- Lemay, M.-J., Choquette, J., Delaquis, P. J., Gariépy, C., Rodrigue, N., Saucier, L. 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat. International Journal of Food Microbiology. 78 (3). 217-226.
- Luna, A., Lábaque, M.C., Zygadlo, J. A., Marin, R. H. 2010. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. Poultry Science. 89 (2). p. 366-370.
- Lücke, FK. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Science. 56 (2). 105-115.

Marejková, M., Roháčová, H., Reisingerová, M., Petráš, P. 2011. Velká německá epidemie vyvolaná shigatoxigenním kmenem *Escherichia coli* O104:H4 a jeden importovaný případ v České republice. Zprávy Centra Epidemiologie a Mikrobiologie (SZÚ, Praha). 20 (5). 170-173.

Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., Corbo, M. R. 2009. Combined effects of thymol, carvacrol and temperature on the quality of non conventional poultry patties. Meat Science. 83 (2). p. 246-254.

McDonald, K., Sun, DV. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. International Journal of Food Microbiology. 52 (1-2). 1-27.

Mead, G. C. 2007. Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs. Woodhead Publishing Limited. Cambridge. p. 348. ISBN-13: 978-1-84569-059-5.

Mikóczyová, V., Kameník, J. 2013. Vakuum nebo ochranná atmosféra?: Podíl typů balení masných výrobků v prodejnách vybraných maloobchodních řetězců v ČR. Maso. 24 (1). 21-25.

Ntzimani, A. G., Gitrakou, V. I., Savvaidis, I. N. 2011. Combined natural antimicrobial treatments on a ready-to-eat poultry product stored at 4 °C and 8 °C. Poultry Science. 90 (4). 880-888.

Novák, J., Skalický, M. 2009. Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika. Vyd. 2., dopl. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN: 978-80-904011-5-0.

Novak, J., Bahoo, L., Mitteregger, U., Franz, Ch. 2006. Composition of individual essential oil glands of savory (*Satureja hortensis* L., Lamiaceae) from Syria. Flavour and Fragrance Journal. 21 (4). 731-734.

Nychas, E. GL., Skandamis, P. N., Tassou, C. Ch., Koutsoumanis, P. K. 2008. Meat spoilage during distribution. Meat Science. 78 (1-2). 77-89.

Oral, N., Vatansever, L., Sezer, C., Aydin, B., Güven, A., Gülmez, M., Baser, K. H. C., Kürkcüoğlu, M. 2009. Effect of absorbent pads containing oregano essential oil on the shelf

life extension of overwrap packed chicken drumsticks stored at four degrees Celsius. Poultry Science. 88 (7). p. 1459-1465.

Ovísková, V., Valchař, P. 2012. Koření v masných výrobcích: Saturejka. Maso. 23 (5). 21-24.

Rahman, M. S. 1999. Handbook of Food Preservation. Marcel Dekker. New York. p. 809. ISBN: 0-8247-0209-3.

Robertson, L. G. 2010. Food packaging and shelf life – a practical guide, CRC Press, US, p. 388. ISBN: 978-1-4200-7844-2.

Růžičková, G. 2012. Silice – obsahové látky léčivých rostlin. Úroda. 50 (9). 8-9.

Saláková, A. 2013. Vybrané chemické projevy kažení masa. Maso. 24 (5). 28-31.

Sanchez-Garcia, M. D., Lopez-Rubio, A., Lagaron, J. M. 2010. Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications. Trends in Food Science and Technology. 21 (11). p. 528-536.

Silla Santos, M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology. 29 (2-3). 213-231.

Skandamis, N. P., Nychas, G.-J. E. 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. International Journal of Food Microbiology. 79 (1-2). p. 35-45.

Skandamis, P., Tsigarida, E., Nychas, G.-J. E. 2000. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 16 (1). 31-35.

Sofos, J. N. 2008. Challenges to meat safety in the 21st century. Meat Science. 78 (1-2). 3-13.

Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.-L., Wright, A. 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food and Chemical Toxicology. 37 (8). p. 813-823.

SZÚ. 2016. Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2006-2015 – absolutně. Data a statistické údaje. [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z <<http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2006-2015-absolutne>>.

Tornuk, F., Hancer, M., Sagdic, O., Yetim, H. 2015. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. *LWT – Food Science and Technology*. 64 (2). p. 540-546.

Valchař, P. 2013. Koření v masných výrobcích: Tymián. *Maso*. 24 (6). 32-35.

Verma, K. N., Moore, E., Blau, W., Volkov, Y., Babu, P. R. 2012. Cytotoxicity evaluation of nanoclays in human epithelial cell line A549 using high content screening and real-time impedance analysis. *Journal of Nanoparticles Research*. 14 (9). 1137.

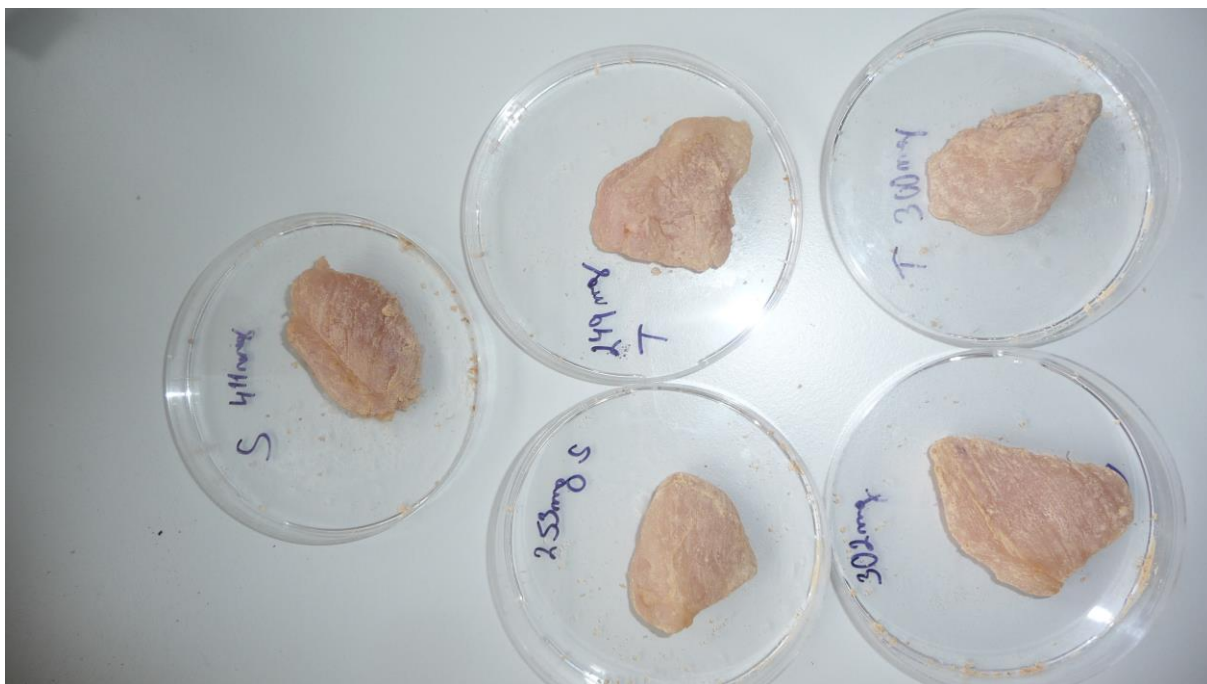
Zhou, G. H., Xu, X. I., Liu, Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*. 86 (1). 119-128.

9 Přílohy

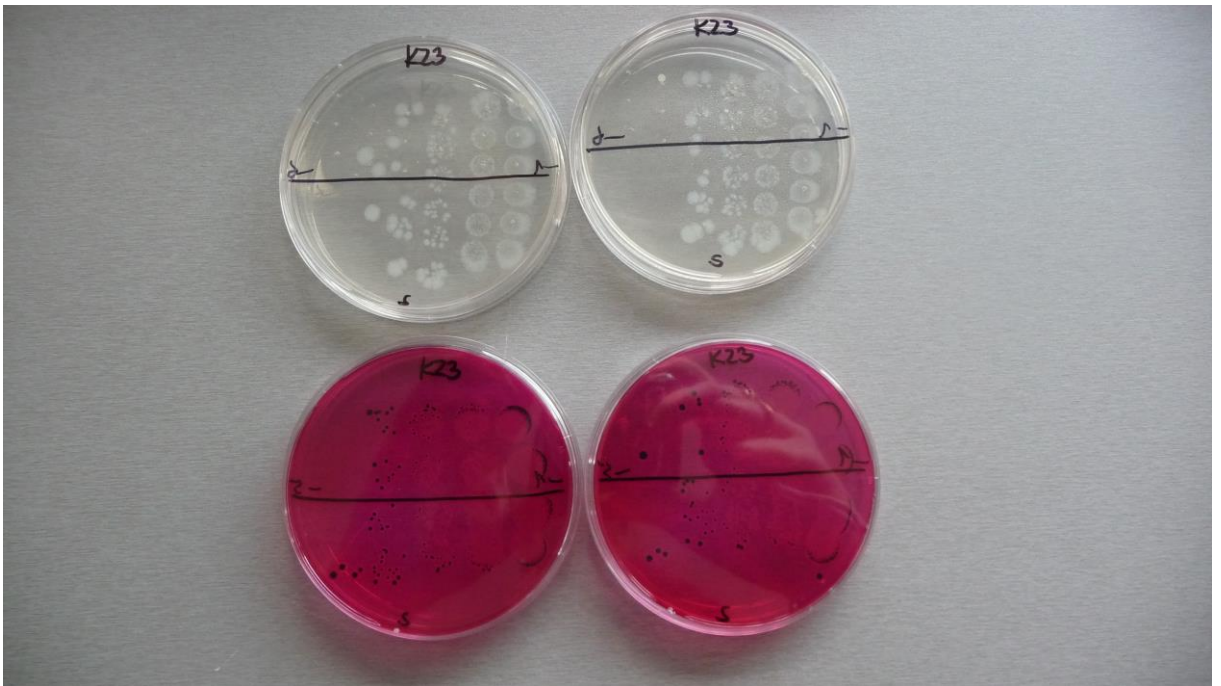
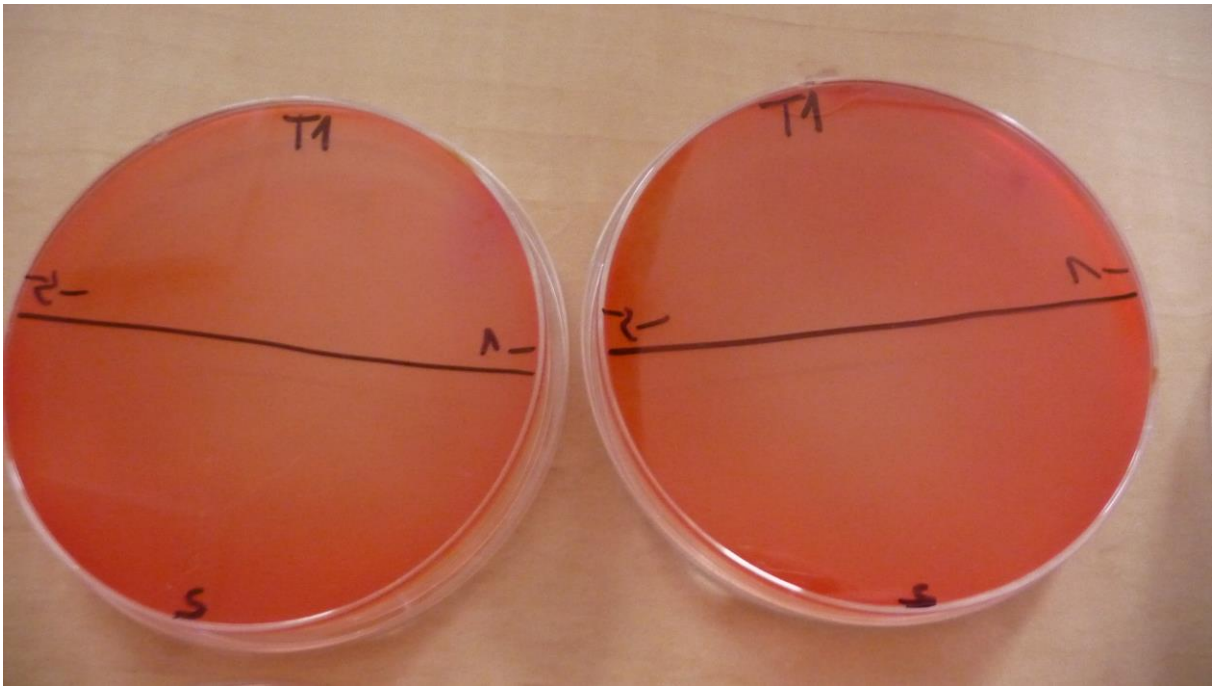
Příloha 1 Enkapsulace silic.



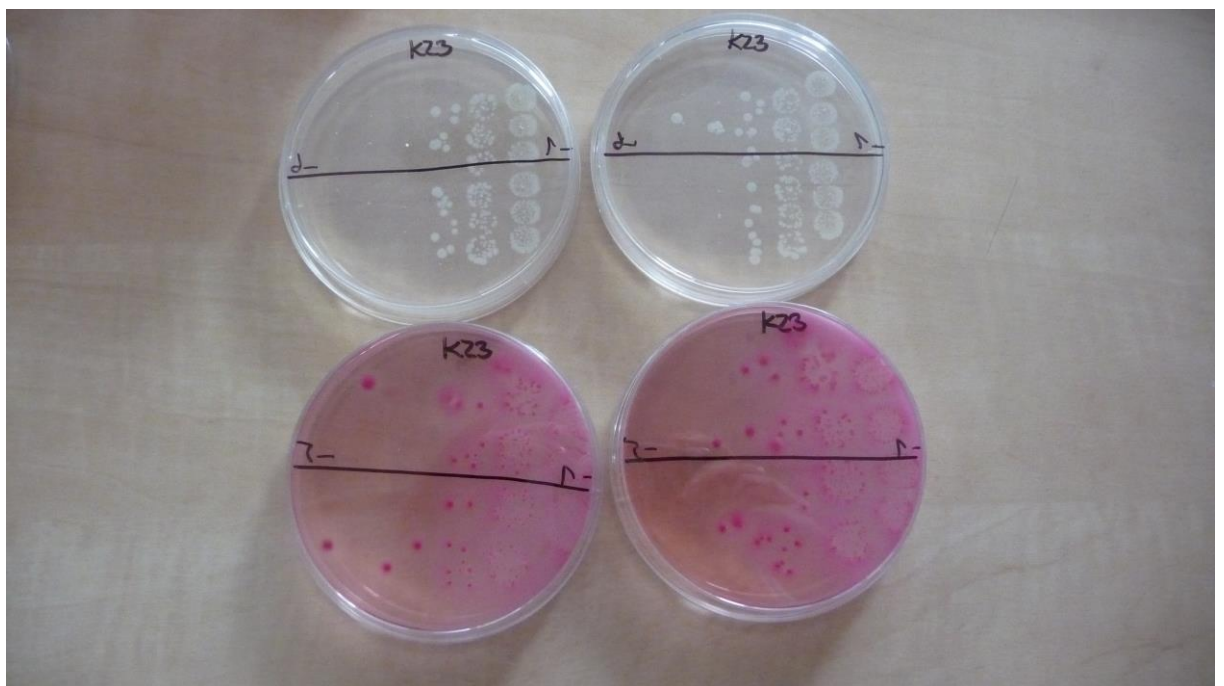
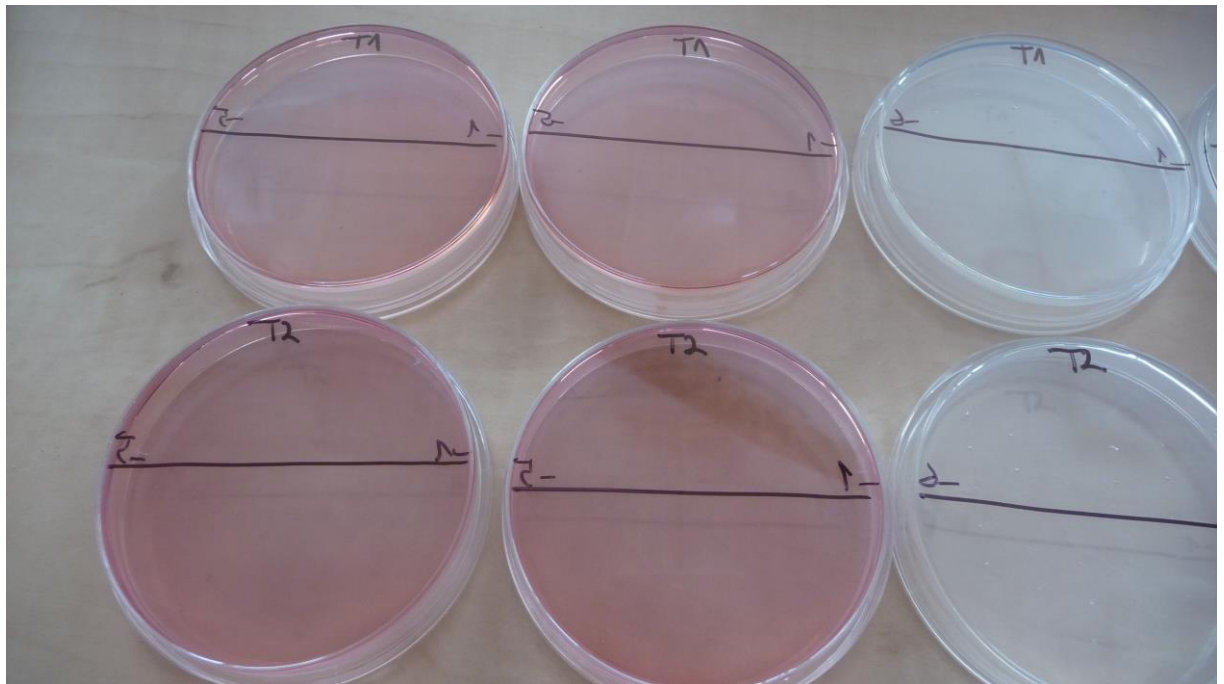
Příloha 2 Aplikace jílových nanočástic na kousky kuřecího masa.



Příloha 3 Antimikrobiální aktivita tymiánové silice (T) proti bakterii *Salmonella enteritidis*, srovnání s kontrolou zaočkování (KZ).



Příloha 4 Antimikrobiální aktivita tymiánové silice (T) proti bakterii *Escherichia coli*, srovnání s kontrolou zaočkování (KZ).



Příloha 5 Formulář senzoričké analýzy.

HODNOCENÍ KUŘECÍHO MASA

Jméno a příjmení:..... **Zdravotní stav:**.....

Datum:..... **Hodina:**..... **Vzorek č.:**.....

Úkol: Ochutnejte předložený vzorek masa. K hodnocení použijte grafické stupnice. Hodnocení zaznamenejte čárkou na úsečce.

CELK. PŘÍJEMNOST
VZHLEDU: _____
odporná _____ velmi příjemná

CELK. PŘÍJEMNOST
VŮNĚ: _____
odporná _____ velmi příjemná

CELK. INTENZITA
VŮNĚ: _____
neznatelná _____ velmi silná

INTENZITA VŮNĚ
KOŘENÍ: _____
neznatelná _____ velmi silná

CELK. PŘÍJEMNOST
CHUTI: _____
odporná _____ velmi příjemná

CELK. INTENZITA
CHUTI: _____
neznatelná _____ velmi silná

INTENZITA DRŮBEŽÍ
CHUTI: _____
neznatelná _____ velmi silná

INTENZITA CHUTI
KOŘENÍ: _____
neznatelná _____ velmi silná

INTENZITA HOŘKÉ
CHUTI: _____
neznatelná _____ velmi silná

INTENZITA ŠTIPLAVÉ
CHUTI: _____
neznatelná _____ velmi silná

CELK. INTENZITA
PACHUTÍ: _____
neznatelná _____ velmi silná

Uveďte prosím, jaké pachutě jste zaznamenali:.....

CELKOVÁ
PŘIJATELNOST
VZORKU: _____
zcela nepříjemný _____ vynikající

Příloha 6 Tabulka korelačních vztahů mezi jednotlivými deskripty.

	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Celková příjemnost vzhledu	Celková příjemnost vůně	Celková intenzita vůně	Intenzita vůně koření	Celková příjemnost chuti	Celková intenzita chuti	Intenzita drůbeží chuti	Intenzita chuti koření	Intenzita hořké chuti	Intenzita štiplavé chuti	Celková intenzita pachuti	Celková přijatelnost vzorku
Celková příjemnost vzhledu	51,700	15,141	1,000	0,405	0,038	-0,124	0,129	0,165	0,374	0,119	0,007	-0,046	-0,275	0,289
Celková příjemnost vůně	42,083	22,350	0,405	1,000	-0,180	-0,457	0,552	-0,090	0,737	-0,329	-0,317	-0,382	-0,578	0,722
Celková intenzita vůně	64,400	17,743	0,038	-0,180	1,000	0,464	-0,249	0,470	-0,280	0,369	0,056	0,243	0,103	-0,304
Intenzita vůně koření	51,100	31,072	-0,124	-0,457	0,464	1,000	-0,389	0,439	-0,669	0,834	0,436	0,601	0,478	-0,558
Celková příjemnost chuti	37,767	22,275	0,129	0,552	-0,249	-0,389	1,000	-0,279	0,593	-0,238	-0,442	-0,482	-0,640	0,820
Celková intenzita chuti	61,467	19,447	0,165	-0,090	0,470	0,439	-0,279	1,000	-0,223	0,623	0,438	0,459	0,286	-0,362
Intenzita drůbeží chuti	42,917	24,050	0,374	0,737	-0,280	-0,669	0,593	-0,223	1,000	-0,473	-0,518	-0,665	-0,696	0,717
Intenzita chuti koření	52,017	30,092	0,119	-0,329	0,369	0,834	-0,238	0,623	-0,473	1,000	0,446	0,514	0,377	-0,422
Intenzita hořké chuti	41,233	32,312	0,007	-0,317	0,056	0,436	-0,442	0,438	-0,518	0,446	1,000	0,827	0,735	-0,467
Intenzita štiplavé chuti	35,967	31,871	-0,046	-0,382	0,243	0,601	-0,482	0,459	-0,665	0,514	0,827	1,000	0,736	-0,531
Celková intenzita pachuti	38,850	30,759	-0,275	-0,578	0,103	0,478	-0,640	0,286	-0,696	0,377	0,735	0,736	1,000	-0,638
Celková přijatelnost vzorku	35,250	22,288	0,289	0,722	-0,304	-0,558	0,820	-0,362	0,717	-0,422	-0,467	-0,531	-0,638	1,000

Pozn.: Zvýrazněné korelace jsou významné na hladině $p < 0,05$

10 Seznam tabulek

Tabulka 1 Varianty ošetření vzorků 44

Tabulka 2 Statistické zhodnocení deskriptorů u vzorků ošetřených tymiánovou silicí [%].
..... 57

Tabulka 3 Statistické zhodnocení deskriptorů u vzorků ošetřených silicí ze satirejky [%].
..... 58

11 Seznam grafů

Graf 1 Počty bakterií <i>Salmonella enteritidis</i> , koncentrace silice 1:5.....	49
Graf 2 Počty bakterií <i>Salmonella enteritidis</i> , koncentrace silice 1:10.....	49
Graf 3 Počty bakterií <i>Escherichia coli</i> , koncentrace silice 1:5.....	51
Graf 4 Počty bakterií <i>Escherichia coli</i> , koncentrace silice 1:10.....	51
Graf 5 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaného bakterií <i>Salmonella enteritidis</i> , koncentrace silice 1:5.	52
Graf 6 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaného bakterií <i>Salmonella enteritidis</i> , koncentrace silice 1:10.	53
Graf 7 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaného bakterií <i>Escherichia coli</i> , koncentrace silice 1:5.....	54
Graf 8 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaných bakterií <i>Escherichia coli</i> , koncentrace silice 1:10.....	54
Graf 9 Hodnocení deskriptorů senzoričké analýzy u vzorků ošetřených tymiánovou silicí [%].	55
Graf 10 Hodnocení deskriptorů senzoričké analýzy u vzorků ošetřených silicí ze saturejky [%].....	56